

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03826243.6

[43] 公开日 2006 年 4 月 12 日

[11] 公开号 CN 1759189A

[22] 申请日 2003.8.6 [21] 申请号 03826243.6
[30] 优先权
[32] 2003. 2. 24 [33] US [31] 60/449,786
[86] 国际申请 PCT/US2003/024529 2003. 8. 6
[87] 国际公布 WO2004/076695 英 2004. 9. 10
[85] 进入国家阶段日期 2005. 9. 28
[71] 申请人 GTC 生物治疗学公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 D·E·克托 A·拉沃蒂尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 4 页 说明书 56 页 附图 10 页

[54] 发明名称

切向流过滤方法及其装置

[57] 摘要

本发明提供了用于将目标分子从包含它们的混合物中分离出来的工艺过程和设备，包含用改进的切向流过滤(TFF)方法对混合物进行处理。使用该改进的 TFF 可澄清、处理多种料液，以取出目标分子。根据一项优选的实施方案，使转基因乳液流稳定并且除去颗粒状物理例如脂肪和酪蛋白微球以及细菌。在本发明中使用的 TFF 方法利用了优化的工艺参数，包括温度、跨膜压力、交叉流速度和乳汁的浓度。还开发出了清洁和储存操作流程，以保证膜具有长的使用寿命。还开发出了无菌过滤步骤，以从澄清过的转基因乳汁料液中除去残留的任何细菌。

1. 从料液中分离目标分子物质的方法，该方法包含：(a)用切向流过滤工艺通过滤膜将所述的料液过滤，所述滤膜具有的孔径大小可以将所述的目标分子物质从所述的料液中分开，同时保持通量水平在“通量-TMP曲线”的压力依赖性区域内临界点通量的大约5-100%，其中所述跨膜压力沿着膜大体保持恒定，其水平不高于过滤临界点处的跨膜压力，从而将所述的目标分子物质从所述的料液中选择性地分离出来，并使所述的目标分子物质保持其生物活性；(b)通过微滤工艺过滤所述的料液；其中所述的目标分子物质是蛋白质。

2. 权利要求1的方法，还包含将所述的料液分级分离。

3. 权利要求1的方法，还包含使所述的料液澄清。

4. 权利要求1的方法，还包含对所述的料液进行透滤。

5. 权利要求1的方法，还包含将所述的料液浓缩。

6. 权利要求1的方法，其中所述目标分子物质分子量为大约1到1000kDa。

7. 权利要求1的方法，其中所有的过滤阶段都是超滤。

8. 权利要求1的方法，其中所述的料液是乳汁。

9. 权利要求1的方法，其中所述的料液是细胞裂解物溶液。

10. 权利要求1的方法，其中所述的蛋白质是生物药剂。

11. 权利要求8的方法，其中所述乳汁的状态选自以下状态中的一种：a) 未经处理的；b) 稀释的；c) 使用缓冲溶液处理过的；d) 经化学处理过的；以及 e) 部分蒸发的。

12. 权利要求2的方法，其中所述的分级分离步骤使用陶瓷材质的滤膜。

13. 权利要求3的方法，其中所述的澄清步骤使用陶瓷材质的滤膜。

14. 权利要求2的方法，其中所述的分级分离步骤使用聚合物滤膜。

15. 权利要求3的方法，其中所述的澄清步骤使用聚合物滤膜。

16. 权利要求2的方法，其中所述的分级分离步骤使用纤维素滤

膜。

17. 权利要求 3 的方法, 其中所述的澄清步骤使用纤维素滤膜。
18. 权利要求 2 的方法, 还包含优化系统参数。
19. 权利要求 18 的方法, 其中所述的系统参数包括温度、料液流速、跨膜压力、料液浓度和透滤体积。
20. 权利要求 3 的方法, 还包含优化系统参数。
21. 权利要求 20 的方法, 其中所述的系统参数包括温度、料液流速、跨膜压力、料液浓度和透滤体积。
22. 权利要求 1 的方法, 其中所述的目标分子物质是选自下组中的生物实体: 蛋白质、免疫球蛋白、多肽、肽、糖蛋白、RNA 和 DNA。
23. 权利要求 19 的方法, 其中最适温度范围是 15 到 50 摄氏度。
24. 权利要求 19 的方法, 其中最适温度范围是 20 到 35 摄氏度。
25. 权利要求 19 的方法, 其中最适温度范围是 25 到 29 摄氏度。
26. 权利要求 21 的方法, 其中最适温度范围是 15 到 50 摄氏度。
27. 权利要求 21 的方法, 其中最适温度范围是 20 到 35 摄氏度。
28. 权利要求 21 的方法, 其中最适温度范围是 25 到 29 摄氏度。
29. 权利要求 19 的方法, 其中料液流速是从 10cm/sec 到 100cm/sec。
30. 权利要求 19 的方法, 其中料液流速是从 20cm/sec 到 60cm/sec。
31. 权利要求 19 的方法, 其中料液流速是从 25cm/sec 到 45cm/sec。
32. 权利要求 21 的方法, 其中料液流速是从 10cm/sec 到 100cm/sec。
33. 权利要求 21 的方法, 其中料液流速是从 20cm/sec 到 60cm/sec。
34. 权利要求 21 的方法, 其中料液流速是从 25cm/sec 到 45cm/sec。
35. 权利要求 19 的方法, 其中跨膜压力范围是从 2psi 到 40psi。
36. 权利要求 19 的方法, 其中跨膜压力范围是从 5psi 到 30psi。
37. 权利要求 19 的方法, 其中跨膜压力范围是从 10psi 到 20psi。
38. 权利要求 21 的方法, 其中跨膜压力范围是从 2psi 到 40psi。
39. 权利要求 21 的方法, 其中跨膜压力范围是从 5psi 到 30psi。

40. 权利要求 21 的方法, 其中跨膜压力范围是从 10psi 到 20psi。
41. 权利要求 19 的方法, 其中料液浓度是天然乳汁的 0.25 到 4 倍。
42. 权利要求 19 的方法, 其中料液浓度是天然乳汁的 0.5 到 3 倍。
43. 权利要求 19 的方法, 其中料液浓度是天然乳汁的 1.0 到 2 倍。
44. 权利要求 21 的方法, 其中料液浓度是天然乳汁的 0.25 到 4 倍。
45. 权利要求 21 的方法, 其中料液浓度是天然乳汁的 0.5 到 3 倍。
46. 权利要求 21 的方法, 其中料液浓度是天然乳汁的 1.0 到 2 倍。
47. 权利要求 19 的方法, 其中透滤体积范围是浓缩的微滤截留物体积的 1 到 20 倍。
48. 权利要求 19 的方法, 其中透滤体积范围是浓缩的微滤截留物体积的 3 到 15 倍。
49. 权利要求 19 的方法, 其中透滤体积范围是浓缩的微滤截留物体积的 5 到 10 倍。
50. 权利要求 21 的方法, 其中透滤体积范围是浓缩的微滤截留物体积的 1 到 20 倍。
51. 权利要求 21 的方法, 其中透滤体积范围是浓缩的微滤截留物体积的 3 到 15 倍。
52. 权利要求 21 的方法, 其中透滤体积范围是浓缩的微滤截留物体积的 5 到 10 倍。
53. 权利要求 2 的方法, 其中超滤膜用于所有的过滤步骤。
54. 权利要求 5 的方法, 其中超滤膜用于所有的过滤步骤。
55. 权利要求 8 的方法, 其中所述的乳汁用选自下组中的溶液进行处理: a) 水; b) 缓冲盐水溶液; c) 螯合剂; d) 酸溶液; 以及 e) 碱溶液。
56. 权利要求 4 的方法, 其中所述的透滤使用超滤透过物。
57. 权利要求 4 的方法, 其中所述的透滤使用水。
58. 权利要求 4 的方法, 其中所述的透滤使用缓冲盐溶液。
59. 权利要求 1 的方法, 其中使用的膜用温度高于 20 摄氏度的溶液进行清洁。

60. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜用温度范围在 20 到 70 摄氏度的溶液进行清洁。

61. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜用温度范围在 40 到 60 摄氏度的溶液进行清洁。

62. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜用酸溶液进行清洁。

63. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜用碱溶液进行清洁。

64. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜用次氯酸盐溶液进行清洁。

65. 权利要求 62、63 或 64 的方法，还包括在使用所选的溶液之后用水漂洗。

66. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜在使用之前用氢氧化物溶液进行消毒。

67. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜在使用之前用醇溶液进行消毒。

68. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜在使用之前用次氯酸盐溶液进行消毒。

69. 权利要求 1 的方法，其中使用的膜的清洁时间为 20 分钟到 45 分钟。

70. 权利要求 1 的方法，其中还包括将第二个切向流过滤阶段的滤出液通过孔径比在第一个过滤阶段中使用的膜的孔径更小的膜进行过滤，并且将第二个过滤阶段的滤出液返回到第一个过滤阶段，如此重复该过程。

切向流过滤方法及其装置

发明领域

本发明提供了改善的方法和系统，用于从污染物中分离特异的目标分子。更特别地，本发明涉及通过改进的切向流过滤（tangential flow filtration）方法处理样品溶液，该改进的切向流过滤方法提高了从给定的料液中对所需分子的澄清、浓缩和分级分离。

发明背景

本发明涉及的是从给定的料液（feedstream）中过滤目标分子的改进方法。应当注意的是，生产大量较纯的、具有生物活性的分子对于节约有效地生产人和动物的药用配方、蛋白质、酶、抗体和其他特殊化学物质是非常重要的。重组 DNA 技术已经成为可选择的方法用于生产多种多肽、抗体和蛋白质，因为大量的外源蛋白质或者抗体可以在细菌、酵母、昆虫或者哺乳动物细胞培养物中表达。最近以来，已经通过工程操作或者其他方式的改变使转基因动物（主要是哺乳动物，但是也包括禽类）或者甚至是转基因植物大量产生外源的蛋白质、抗体或者它们的片段或融合物。通过重组 DNA 技术表达蛋白质用于生产作为生物催化剂起作用的细胞或者细胞部分，也是一项重要的应用。

重组蛋白的生产包括用编码该蛋白质的 DNA 转染宿主细胞以及在有利于重组蛋白质或者其他目标分子表达的条件下培养宿主细胞、转基因动物或者植物。原核生物大肠杆菌已经成为一个受偏爱的宿主系统，因为可以将其改造，从而生产大量重组蛋白。但是，已经开发出从大肠杆菌到牛的多种不同的表达平台，因此有众多的关于一般表达蛋白编码 DNA 的美国专利。

随着从生物体系中生产外源蛋白质或者其他目标分子的工作的改善，工业上面临着更大的压力，要求开发出新的技术，以提高用于这样生产出的生物制品和药物的纯化和回收工艺，并使其更为有效。那就是，随着新产品的供应增加，随之出现了对于设计出使这些治疗药剂（以商业量）迅速上市的方法的巨大兴趣。同时工业上还面临着新的挑战，即开发从各种机体流体（包括乳汁和尿）中回收转基因蛋白质和抗体的新型工艺。生产的规模越大，这些问题经常变得更为复杂。此外，工业上还面临着其他的挑战，涉及产品的纯度和安全性达标方面，主要涉及的方面是病毒安全性和残留污染物例如 DNA 和宿主细胞蛋白质，标准，这样的标准是许多监管生物用途药物生产的政府机构都可能要求达到的。

目前有多种可用于从混合物中分离生物学目标分子例如蛋白质的方法。这些技术中重要的一项是亲和层析，它对分子的分离是基于所需的分子与亲和介质或者凝胶的特异性、选择性结合，而不需要的分子不能结合因此可以从体系中去掉。亲和凝胶通常由固定在凝胶支持物上的配基结合部分组成。例如 GB2,178,742 使用了亲和层析方法将血红蛋白及其化学修饰衍生物纯化出来，其依据的原理是天然血红蛋白可与一个特殊的多聚阴离子部分家族特异结合。将这些部分固定在凝胶上，以捕获目标分子。在这一过程中，未修饰的血红蛋白被亲和凝胶保留，而被修饰的血红蛋白由于其多聚阴离子结合位点被修饰剂所共价占据而不能与凝胶结合，所以从体系中被除去。亲和层析柱是高度特异的，所以会产生非常纯的产物，但是亲和层析是一个相对较昂贵的工艺，因此很难在商用操作中运用。

通常情况下，经遗传工程操作的生物药物是从含有多种不同的宿主细胞污染物的上清中纯化出来的。可以使用反相高效液相层析（RP-HPLC）纯化蛋白质，因为它可以有效地将结构或者重量都极其相似的分子分开。使用 RP-HPLC 分离多种分子的技术操作已经发表。

McDonald and Bidlingmeyer, "Strategies for Successful Preparative Liquid Chromatography", PREPARATIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY, Brian A. Bidlingmeyer (New York: Elsevier Science Publishing, 1987), vol. 38, pp. 1-104; Lee et al., Preparative HPLC. 8th Biotechnology Symposium, Pt. 1, 593-610 (1988).

膜类在产业规模的分子产物回收工艺中的使用以及多种类型的膜和膜技术的相关使用也是为人所知的。这些方法中的基本特点是悬浮于液体料液中的颗粒根据其大小进行分离。在这一工艺的最简单形式中，用压力迫使溶液通过具有固定大小孔的过滤膜。大于过滤膜孔径大小的颗粒被截留，而较小的溶质与溶剂被一同带到膜的另一侧。根据膜的孔径大小，这种膜过滤工艺一般属于反渗透、超滤和微过滤类型。

重要的还应该提及作为分离技术的膜过滤在生物技术领域内被广泛应用。根据膜的类型，膜过滤可以分为微滤或者超滤。微滤膜的孔径大小在 0.1 到 10 微米之间，通常用于澄清、除菌和微小颗粒物的去除，或者用于细胞收获。超滤膜的孔径大小要小得多，在 0.001 到 0.1 微米之间，用于将溶解的分子（蛋白质、多肽、核酸、糖和其他生物分子）分开和浓缩，或者交换缓冲液，以及粗分级。

目前有两种主要的膜过滤方法：单向通过或者直接流过滤 (Direct Flow Filtration, DFF) 以及交叉流或者切向流过滤 (Tangential Flow Filtration, TFF)。TFF 是一种超滤系统，其被设计成控制料液的流体流动型式，以提高被截留的溶质从膜表面向料液中的回输。在这个过程中，料液高速地重复循环，方向与膜的平面相切。这样进行的效果是可以提高传质系数 (mass-transfer coefficient)，允许反向扩散。流体流动的方向与滤膜的方向平行，这也使滤膜表面不断被

清洁，从而防止了堵塞。

但是对于超滤中可以达到的蛋白质纯化程度存在限制。这些限制主要是由于浓度极化、淤积以及大多数膜的孔径大小分布过宽造成的。因此溶质分开的情况经常很差。参见例如 Porter, ed., HANDBOOK OF INDUSTRIAL MEMBRANE TECHNOLOGY (Noyes Publications, Park Ridge, N. J., 1990), pp. 164-173.

溶质的极化层成为额外的一层滤膜，基本上与原来的超滤膜串联作用。这一作用在过滤给定溶剂时导致了明显的阻力。随着料液中被截留溶质浓度的提高，极化程度将提高，并且在真实系统中会导致许多看起来反常的或者不可预知情况的发生。例如，在高度极化的条件下，过滤速率随着压力的增加而只有小幅增加，这与未极化条件下的过滤速度通常与压力呈线性的关系相反。使用更加开放、更高通量的膜可能不会提高过滤速度，因为极化层仍然对过滤提供着限制性的阻力。由于截留的和洗脱的溶质之间的相互作用，这一情形将更为恶化。

浓度极化和污染过程的一个结果是不能有效利用超滤膜对大分子分级的能力用于大分子混合物例如血浆蛋白的大规模拆分中。参见 Michaels, "Fifteen Years of Ultrafiltration : Problems and Future Promises of an Adolescent Technology", in ULTRAFILTRATION MEMBRANES AND APPLICATIONS, POLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY, 13 (Plenum Press, N. Y. , 1979, Anthony R. Cooper, ed. ,), pp. 1-19.

因此，用其他和额外的技术分离更多种类的生物分子是很困难的。也就是说，通过凝胶渗透、吸附或者离子交换层析、选择性沉淀或者电泳这类技术进行的复杂大分子混合物大规模分离中使用膜超滤是异

常困难的，且不适于商业的应用。TFF 通过将混合物重复循环而解决这个堵塞的问题。

用切向流过滤分离物质的技术是已知的。Marinaccio et al., 美国专利编号 4, 888, 115 中公开了将该过程（称为“交叉流”）用于分离生物性液体（例如分离血液组分用于血浆除去法）。在该过程中，血液切向通过（即跨过）有机多聚微孔滤膜，并除去颗粒状物质。在现有技术的另一个实施例中，切向流过滤被用于啤酒溶液的过滤（Shackleton, EP 0, 208, 450, 1987 年 1 月 14 日发表），它特别用于除去例如酵母细胞和其他悬浮固体等颗粒状物质。Kothe et al.（美国专利 4, 644, 056, 1987 年 2 月 17 日颁布）公开了这一工艺用于从乳汁或者初乳中纯化免疫球蛋白，Castino（美国专利 4, 420, 398, 1983 年 12 月 13 日颁布）描述了切向流过滤用于从包含抗病毒物质以及病毒颗粒和抗病毒物质所来源的细胞培养物残渣的肉汤中分离抗病毒物质，例如干扰素。

已经在从细胞残渣中分离细菌酶时使用过切向流过滤装置（Quirk et al., 1984, Enzyme Microb. Technol. , 6 (5): 201）。与使用传统的离心技术相比，使用这一技术，Quirk et al. 能够在较短的时间内分离出更大量的酶。在制药领域中切向流过滤的多种应用在 Genovesi (1983, J. Parenter. Sci. Technol. , 37 (3): 81) 中有综述，应用包括注射用无菌水的过滤、溶剂系统的澄清以及从肉汤和细菌培养物中过滤酶。

但是对于该技术用于商业应用所需的颗粒大小的精确控制还很困难并且还未普遍获得成功。在本发明中对切向流过滤的使用进行了改良，用于在商用的高效且重要的工艺中根据大小分离颗粒。本发明公开了使用具有所选尺寸的滤膜以及依次使用或者串联叠加不同孔径大小的滤膜（即过滤系统），以分离颗粒状物质，获得具有所需的特定

大小范围的颗粒。

在本领域内还需要有高效的实验方案，用于使用一种提高产量、较为便宜以及减少变性的工艺而从其他分子中选择性地分离例如肽、多肽和非肽类物质等分子。特别地，需要有纯化技术，以便从细胞培养使用的发酵培养液中或者从转基因哺乳动物产生的乳汁料液中分离出目标分子。

可以从细胞培养液或者转基因乳汁料液中纯化出的这样一种目标分子是人白蛋白。人白蛋白是临床用作血容量扩充剂的第一种天然胶体组合物，并且它是与其他胶体分子进行比较的标准胶体试剂。其他目标分子包括，但不限于，人甲胎蛋白、抗体、抗体的 Fc 片段以及人白蛋白或者甲胎蛋白片段作为载体分子的融合分子。

本发明的方法还提供了滤器和过滤条件的精确组合，以便优化从给定料液中获得目标分子的产量。在这些方法中重要的过程参数包括 pH 和温度被精确地调控。

本发明的一个目的是提供切向流过滤工艺，用于根据大小分离物质，例如颗粒和分子，其中所述工艺对于目标物是选择性的，从而能够更高倍地纯化。

另外一个目的是提供改进的过滤工艺，包括超滤工艺，用于分离生物大分子如蛋白质，该工艺使浓度极化最小化，并且不增加通量。

另外一个目的是提供一种过滤工艺，它可以根据大小分离大小相差不到 10 倍的物质，并且在过滤之前不需要对混合物进行稀释。

这些以及其他目的对于本领域内的技术人员将会变得明确。本发

明的其他特点和优势将会在以下本发明优选实施方案的详细描述并参考相伴随的附图而变得明确。

生物制剂产业正在越来越关注产品的安全性、纯度以及成本。根据本发明使用切向流过滤(TFF)是一种迅速且更高效的生物分子分离方法。它可以用于广泛的生物学领域,例如免疫学、蛋白质化学、分子生物学、生物化学和微生物学。

附图的简要描述

图1显示了物质从料液通过TFF到灌装和结束的流程的工艺流程图。

图2A显示了微滤的工艺和设备安装。

图2B显示了TFF的工艺和设备安装。

图3显示了在高温和低温下酪蛋白产品去除的比较。

图4显示了过滤工艺的流程。

图5显示了从DNA构建体到含有重组目标蛋白质的澄清乳汁产生的转基因动物构建过程。

图6显示了本发明的方法的工艺设备图示。

图7显示了不同TMP下人单抗#A通过微滤膜的流体动力学性质与交叉流速度的关系。当TMP从12psi上升到20psi时出现了显著的发展。

图8显示了人单抗#A通过微滤膜的温度依赖性。提供了细胞培养物抗体和转基因抗体。

图9显示了来自GTC微滤工艺中的不同级分的SDS-PAGE分析结果。其中显示,与全乳汁(#3泳道)相比,4倍澄清化的乳汁(#7泳道)中酪蛋白的含量降低。

图10显示了根据本发明的TFF工艺,质量平衡以及该工艺的整体产量。

发明概述

简而言之，本发明提供了一种用于加速处理来自多种不同料液、优选来自转基因哺乳动物乳汁的人类治疗性蛋白、蛋白质片段或者抗体的方法。因此，在本发明的一项优选实施方案中，这里开发和提供的过滤技术提供了一种工艺，用于从乳汁的天然组合物或者乳汁的污染物中对所需的重组蛋白或者其他目标分子进行澄清、浓缩和分级。产生的大量澄清中间产物是用于传统的纯化技术例如层析的适宜料液，这些传统纯化技术用于 TFF 工艺的下游，使产品达到其最终的配方和纯度。

本发明的一项优选实验方案使用了三种过滤单元操作，从给定的含有目标分子的转基因乳汁中对产物进行澄清、浓缩和分级。澄清步骤从产物中除去了较大的颗粒状物质例如脂肪球和酪蛋白微球。之后的浓缩和分级步骤除去了大多数小分子，包括乳糖、矿物质和水，提高了纯度且降低了所得产物组合物的体积。将 TFF 过程的产物适当的浓缩至能使下游纯化最适地进行并且使整体产物具有最佳稳定性的水平。然后将该浓缩的产物无菌过滤以保证最低的生物负荷并且提高产物在延长时间段内的稳定性。半成品的纯度在 65%到 85%之间，可能含有的组分包括山羊抗体、乳清蛋白（ α 乳球蛋白、 β 乳白蛋白以及 BSA）、低水平的残留脂肪和酪蛋白。这种部分纯化的产物是常规下游层析技术的理想起始料液。

通常可以使用本发明处理的产物是免疫球蛋白分子，包括但不限于：IgG1（例如针对关节炎的抗体-“Remicade 抗体”），IgG4、IgM、IgA、Fc 部分、含有与免疫球蛋白片段相连的肽或多肽的融合分子。其他可以使用本发明处理的蛋白质包括重组蛋白质、内源蛋白质、融合蛋白或者没有生物学活性、但可以进行后续加工而恢复生物活性的蛋白。其中包括、但是不限于抗凝血酶 III 蛋白、人血清白蛋白、核心蛋白聚糖、人甲胎蛋白、尿激酶和催乳素。

优选实施方案的描述

在说明中以下缩略语具有指定的含义：

缩略语表：

BSA 牛血清白蛋白

CHO 中国仓鼠卵巢细胞

CV 交叉流速率

DFF 直接流过滤

DV 透滤体积

IEF 等电聚焦

GMH 质量通量(克/平方米/小时)-也称为 J_M

LMH 液体通量(升/平方米/小时)-也称为 J_L

lpm 升/分钟

M 摩尔浓度

MF 微滤

NMWC0 额定分子量截留

NWP 标准化的透水性

PES 多聚(醚)砜

pH 根据众所周知的科学参数，用于描述化学物质或者化合物中氢离子活性的术语

PPM 每一百万份中所占的份数

SDS-PAGE SDS(十二烷基硫酸钠)-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)

SEC 大小排阻层析

TEF 切向流过滤

PEG 聚乙二醇

TMP 跨膜压力

UF 超滤

术语的解释：

澄清：从溶液中去掉颗粒状物质，使溶液能够通过 0.2 微米的膜。

胶体：指的是不能容易地跨过毛细管壁的大分子。这些化合物施加肿胀压力(即它们吸引液体)，给服的目的通常是恢复血管内容量，改善组织灌注。

浓缩：用膜将水和小分子除去，使截留的分子对小分子的比例提高。

浓度极化：在膜表面上截留分子的累积(凝胶层)，它是由于多个因素组合而造成的：跨膜压力、交叉流速度、样品黏度和溶质浓度。

交叉流速度：跨膜上层的流体的速度。 $CF=Pi-Po$ ，其中 Pi 是进口的压力，而 Po 是出口的压力， CF 与截留物的流速有关。

透滤：通过膜洗掉较小分子的分级分离过程，使目标大分子留在截留物中。这是一种方便有效的技术，可除去或者交换盐类、除去去污剂、将自由分子与结合分子分开、除去小分子量物质或者迅速改变离子或者 pH 环境。该过程通常使用微滤膜，将目标产物从浆液中分离，而同时保持浆液浓度恒定。

料液：为工艺或者方法所提供的原材料或者原料液，它含有目标蛋白，还可能含有多种不同的污染物，包括微生物、病毒和细胞碎片。

滤出液通量 (J)：样品的一部分通过膜的速率。

流速 (V)：流体通过膜表面的速度被认为是流体的流速。由于流速的改变，需要测量产物通量。两个变量之间的关系使我们确定流动的最佳操作窗口。

分级分离：根据物理或者化学部分而对分子进行优先分离。

凝胶层：显微镜下观察到的分子薄层，它可以在膜的上面形成。它会通过堵塞膜表面而影响分子的截留，因而减缓滤出液的流动。

额定截留分子量 (Nominal Molecular Weight Cut Off, NMWCO)：超滤膜的大小(千道尔顿)指示。截留分子量的定义是被该膜截留 90% 的球蛋白的分子量。

标准化的透水性 (NWP)：TFF 装置起始清洁时在特定的重复循环速率下建立的水滤出液流速。该数值用于计算膜回收率。

目标分子：能够从溶液或者流体（如液体）中的悬液中分离出来的颗粒或者其他种类的分子。颗粒或者目标分子从流体中分离出来，多数情况下与流体中的其他颗粒或者分子分开。将要分离的目标分子的大小将决定要使用的膜的孔径大小。优选地，目标分子是生物或者生化来源的，或者通过转基因或体外过程产生的，包括蛋白质、肽、多肽、抗体或者抗体片段。优选的料液来源实例包括哺乳动物乳汁、哺乳动物细胞培养物以及微生物细胞培养物如细菌、真菌和酵母。还应当注意的是要被滤出的物质包括不合意的多肽、蛋白质、细胞组分、DNA、胶体、支原体、内毒素、病毒、糖和其他生物学分子，不论其是否被糖基化。

切向流过滤：是指这样一个过程，其中含有将要被过滤分离的组分的流体混合物沿着膜平面切线地高速重复循环以提高反向扩散的传质系数。在这种过滤中，沿膜的长度施加压力差，使流体和可滤过的溶质流过滤器。这种过滤最适宜以分批过程和连续流过程进行。例如，可以将溶液反复通过膜，同时通过该滤器的流体被不断回收到分开的装置中，或者使溶液一次通过膜，通过滤器的流体被不间断地进行下

游的处理。

跨膜压力：沿着滤膜的长度施加的不同压力梯度，使得流体和可滤过的溶质流过滤器。在切向流系统中，最高的 TMP 是在入口处（流动管道的开始），最低的 TMP 是在出口处（流动管道的终止）。取入口、出口和滤出液出口的平均压力计算 TMP。

回收率：在处理后能够回收的目标分子的量。经常表示为起始物质的百分比或者产率。

截留物：不能通过膜的样品部分，也被称为浓缩物。在 TFF 过程中截留物被不断地重复循环。

切向流过滤的原理

所有的切向流装置涉及了两个重要的变量：跨膜压力（transmembrane pressure, TMP）和交叉流速度（crossflow velocity, CF）。跨膜压力是实际上推动分子通过滤器小孔的力量。交叉流速度是溶液跨膜的流速。它提供的力将能够堵塞膜而降低该过程的效率的大分子一扫而光。在实际操作中，将流体料液从样品补料容器中泵出，在滤器中跨过膜表面（交叉流），再作为截留物回到样品补料容器中。通过夹具施加在截留物管上的返回压力建立了跨膜压力，可驱动比膜孔径小的分子通过滤器进入滤出液（或者透过物（permeate））级分中。交叉流清除了膜表面上截留的较大分子，使其作为截留物返回到料液中。成功实施 TFF 实验方案的基本目标是对 TMP 和 CF 进行优化，使在不产生膜阻塞性凝胶的情况下可以过滤最大体积的样品。如果 TMP 沿着膜的长度发生的增加或者减少的程度一般不超过平均 TMP 正负约 10psi，优选为不超过约 5psi，则认为 TMP 是“基本恒定的”。就整个过滤过程中的 TMP 水平而言，在浓缩步骤中使 TMP 保持恒定或者降低，以在高浓度下保持选择性。因此“基本

恒定的 TMP”是指 TMP 沿着膜的长度而保持恒定，并不是随着过滤时间而保持恒定。

乳汁作为料液

根据本发明的一个优选实施方案，TFF 过程使用了三种过滤装置操作，对来自乳汁料液的产物进行澄清、浓缩和分级分离。该乳汁可以是含有生物药物或者其他目标分子的转基因哺乳动物的产物。在一个优选的实施方案中，该系统被设计成对目标分子具有高度选择性。澄清步骤从乳汁料液中去除了较大的颗粒状物质，例如脂肪球和酪蛋白微球。浓缩/分级步骤去除了多数小分子，包括乳糖、矿物质和水，提高纯度并降低了产物的体积。此后将 TFF 过程的产物浓缩至适于最佳下游纯化和整体产物稳定性的水平。然后将这一含有目标分子的浓缩产物无菌过滤，以确保最低的生物负荷，提高目标分子在延长时间段内的稳定性。根据本发明的优选实施方案，半成品的纯度在 65%到 85%之间，可以含有的组分例如有山羊抗体、乳清蛋白（ β 乳球蛋白、 α 乳白蛋白以及 BSA）以及低水平的残留脂肪和酪蛋白。这一部分纯化的产物是常规下游层析技术的理想起始料液，可以进一步选择和分离目标分子，所述目标分子可能包括、但是不限于乳汁中产生的重组蛋白、乳汁中产生的免疫球蛋白或者融合蛋白。

步骤 1（澄清）

参考图 1，使用分批微滤对转基因哺乳动物的乳汁、优选地来自山羊或者牛的乳汁进行澄清。将乳汁置于补料罐内，沿环路泵出，使乳汁的截留物浓缩两倍（参见图 1 中的流程图）。浓缩之后，对乳汁截留物进行透滤，使产物和小分子量的蛋白质、糖和矿物质通过适当大小的膜。根据本发明，目前将该操作设计为耗时 2-3 小时，日处理乳汁量 1000 升。本发明的技术和方法可以进行放大，可以生产出的产品的总体积取决于对于某种特定目标分子的商业和/或治疗需要。

步骤 2 (浓缩/分级)

同样参考图 1, 使用超滤 (UF) 对第一步得到的澄清后的透过物进行浓缩和分级。澄清的透过物流入超滤补料罐内, 沿环路泵出, 使产物浓缩两倍。一旦浓缩过程启动, 就将 UF 的透过物置于第一步中的澄清补料罐中的乳汁截留物中。调整第一步和第二步的时间和规模, 使它们同时进行。UF 的透过物含有通过膜的小分子量蛋白质、糖和矿物质。一旦在 UF 的截留物中累积了 95% 的产物, 则停止澄清, 开始对 UF 物质进行浓缩/透滤。将产物浓缩为起始乳汁体积的五分之一到十分之一, 向 UF 补料罐中加入缓冲液。这洗掉了大部分的小分子量蛋白质、糖和矿物质。本操作目前设计为耗时 2.5 到 3.5 小时, 每天可以处理多达 500 升的澄清透过物。同上, 本发明的技术和方法可以被放大, 可以通过本浓缩/分级过程生产出的产品的总体积取决于对于某种特定目标分子的商业和/或治疗需要。

步骤 3 (无菌过滤)

根据图 1, 以及根据本发明, 对澄清的半成品浓缩物进行无菌微滤。将得到的 50-100 升超滤截留物放到补料罐中, 在那里通过一个盲端绝对 0.2 微米 MF 过滤系统将 UF 截留物泵出, 目的是除去大部分的生物负荷、提高产物在延长时间段内的稳定性。将产物通过本发明的过滤系统泵出, 然后可以直接灌注到最终的包装装置中。在加工目标分子的条件, 在达到清洁房间标准 (例如 100 级条件) 的 GMP 设施中, 本操作目前被设计成耗时 0.5 到 1 小时, 每天可以处理多达 100 升的澄清化半成品中间产物。同上, 本发明的技术和方法可以被扩大规模, 可以通过本浓缩/分级过程生产出的产品的总体积取决于对于某种特定目标分子的商业和/或治疗需要。

实施例 1

乳汁作为料液用于生产目标分子

以下的数据提供了本发明的一项应用, 它提供了基于膜的工艺,

可用于对来源于乳汁粗料液中的转基因生产的 IgG1 抗体进行澄清、浓缩和分级。根据本发明的该实施例，提供乳汁用于处理的转基因哺乳动物是山羊，但是也可以使用其他哺乳动物，包括牛、家兔、小鼠以及绵羊和猪。使用 CHO 细胞产生的 IgG1 抗体掺入到非转基因山羊乳汁中，对工艺的起始操作参数范围进行优化。当能够产生该目标分子的转基因山羊到了哺乳期，并且开始在其乳汁中产生重组 IgG1，则使用掺入到非转基因乳汁中的 CHO 细胞产生的重组 IgG1 抗体进行多次实验，然后使用转基因乳汁重复这些实验。

根据本发明，实验性策略是确定可以在大规模下控制的过滤工艺变量 (CM, V, TMP, T) 之间的关系，其中 V 是流速，产物通过、截留和质量也同样可以被控制。通过单独小规模实验矩阵确定关系，并找到操作的最佳窗口。将这些最佳参数组合成“双 TFF”实验系列，对整体产率和质量平衡进行研究。根据产品的产率、澄清度和通量效率确定性能。在单独小规模实验矩阵中研究以下的过程变量。

浓缩 (Cm) 使用经验产物通过数据，确定最佳的乳汁浓缩因子。在固定时间内每平方米内产物通过的速率被称为产物通量 (J_p)。在澄清步骤中根据浓缩因子测定产物通量 (操作装置 #1)。

同样参考图 1，以下提供了对本发明元件的解释

图 1 元件

工艺流描述

液流编号 描述

1a 转基因乳汁原料

1b 微滤的 CIP 溶液

2a 将微滤产生的截留物在透滤后排到排水道中

2b 使用后的 CIP 溶液排到排水道中

- 3 在位的微滤截留物（环）
- 4 微滤 CIP 重复循环（环）
- 5 微滤滤出液
- 6 超滤的 CIP 溶液
- 7 使用后的 CIP 溶液排到排水道中
- 8 超滤料液（微滤滤出液）
- 9 在位的超滤截留物（环）
- 10 超滤透过物（为了透滤 MF 截留物）
- 11 浓缩的澄清化乳汁
- 12 超滤 CIP 重复循环（环）
- 13 AF CIP 溶液
- 14 无菌过滤料液
- 15 生物负荷降低后的浓缩澄清半成品
- 16 使用后的 CIP 溶液排到排水道中

以其最宽泛的方式，这里提供的本发明涵盖的高效切向流过滤过程涉及使将要被分离的物质的混合物通过一个或者更多的位于装置或者组件中的滤膜，该装置或者组件被设计成在某些特定的 TMP 和通量条件下进行的某种切向流过滤类型。TMP 保持在通量对 TMP 曲线中的压力依赖区域的范围内，即不超过临界点 TMP 数值的压力范围。因此，过滤是在通量范围为临界点通量约 5% 到高达 100% 的通量下进行操作。参见以下的图 A 和 B，其中描绘出了通量对 TMP 曲线以及临界点。结果是膜将目标物质作为截留物选择性地截留下来，而更小的物质通过膜作为透过物流出，或者是目标物质作为透过物流过膜，而混合物中的污染物被膜截留。应当注意的是，用于超滤的目标物质优选为分子量至少为大约 1000 道尔顿的生物大分子，最为优选的是多肽和蛋白质。另外优选的是，目标物质的大小比将要同它分开的物质（即污染物）更大倍数小于 20-300 倍，或者比将要同它分开的物质更小，不到其十分之一。

正如这里所使用的，短语“在过滤室内使滤出液按与流体方向平行的方向通过滤出液室重复循环的方式”指的是一种机制或者装置，它引导来自滤出液室的流体的一部分沿着与通过相邻过滤室的流体流动的方向平行或者大体相同的方向（允许在流动中出现一些旋涡），从过滤室的入口流到出口。优选地，该方式是泵抽吸方式。

应注意的是，随着过滤时间的增加，TMP 并不增加，而且在整个过滤过程中也不一定保持恒定。TMP 可以随时间保持大致恒定，或者随过滤的进行有所降低。如果所截留的物质正在进行浓缩，则最好随着浓缩步骤的进程而降低 TMP。

每一个膜优选具有的孔径大小能够截留尺寸大至 10 微米、更优选 1kDa 到 10 微米的物质。可以通过超滤分离的物质的实例包括蛋白质、多肽、胶体、免疫球蛋白、融合蛋白、免疫球蛋白片段、支原体、内毒素、病毒、氨基酸、DNA、RNA 和糖类。可以通过微滤分离的物质的实例包括哺乳动物细胞和微生物，例如细菌。

由于膜过滤器并不完美，可能存在破洞或者不规则处，它们可能比较大而能使得一些要被截留的分子通过膜溜走了，所以本文的一个优选方面是使用一个以上具有相同孔径大小的膜，使膜的放置方式互相平行，优选为一个膜置于另一个膜的上方。用于本目的的膜的优选数目为 2 个。

尽管在以上的过程中维持压力的适宜通量范围是大约 5%到 100%，但是通量越低，则所需的膜的表面积就越大。因此，为了使膜上的花费最小，操作时优选在通量处于该范围高端的压力下进行操作。通量的优选范围是临界点通量的大约 50%到 100%，更为优选的范围是临界点通量的大约 75%到 100%。

尽管 TMP 不需要沿着膜表面维持大体恒定，但是优选地仍使 TMP 维持大体恒定。一般通过在膜的滤出液一侧制造压力梯度来实现这种情况。这样，滤出液通过过滤装置的滤出液室重新循环，循环的方向与过滤装置中截留物室中混合物的流动方向相同和平行。对重新循环的物质的入口和出口压力进行调节，使跨滤出液室的压力降低值与跨截留物室的压力降低值相等。

可以使用多种实际方式获得这种滤出液压力梯度。优选实施方案的一些实施例是图 2A 和 2B 种所示的构件。根据这些构件，将要分离的溶质通过入口导管 36 导入到装置中，如果将要分离的产物是在发酵培养液中，则入口导管与发酵罐（未显示）连接。入口导管还可以连接容器（未显示），该导管承载着转基因（Tg）乳汁或者细胞裂解物来源或者细胞培养系统中细胞收获之后的上清中。泵是本领域内技术人员所知的任何泵，流速可以根据本领域内技术人员所知的过滤性质进行调整。

在本发明的微滤单元 30 中，可选地使用压力计 45 测量来自抽吸装置（pumping means）40 的液流的入口压力。在入口导管 36 内的流体进入到过滤装置 50 中。过滤装置 50 在其入口上方部分含有过滤室 51，在其出口部分含有滤出液室 52。这两个室由过滤膜 55 分开。入口的流体流向与过滤室 51 内的过滤膜平行。上方的过滤室 51 接收含有溶质的混合物（溶质中含有目标分子）。比目标分子小的分子能够通过膜 55 进入到滤出液中或者离开滤出液室 52。浓缩的截留物经出口导管 60 通过过滤装置 50，在那里可以收集截留物，如果需要的话用微滤膜 65 进一步处理，以获得所需的目标物质，包括使截留物再通过另一个膜。在这一整个过程中，以及为了质量控制的目的，本发明预计可以有一系列的样品点 99，使得可以监测分子浓度、pH 和污染-“B 路径”。或者，截留物流回流至混合物来源的罐或者发酵罐 35 内“路径 A”，通过入口导管 36 对截留物重新利用以进一步纯化。

含有经过膜 55 进入到滤出液室 52 的目标分子的溶液还可以通过出口导管 70 离开过滤装置，出口导管 70 和截留物流体离开的出口导管 60 位于过滤单元 50 的同一末端。但是，通过出口导管 70 流出的溶液和目标分子被送回到罐 35 中，由压力计测量，用于进一步的处理。

相似地，以及由图 2B 所描绘的，还涉及了根据本发明的双 TFF 系统 80。

在图 2A 中所示的构件中，需要根据室 51 和 52 放置膜，以提供所示的流速和跨膜压力差。在本发明的工艺中有用的膜的形状一般有平板状、折叠式平板状、圆筒、同心圆筒、各种横断面的管道以及其他的构型，可以单独使用或者成组组装在一起，串联在一起或者在过滤装置内平行排列。装置的构建一般使得过滤和滤出液室的走向沿着膜的长度。

适宜的膜是可以从混合物中将所需的物质与不合意的物质分开而基本上不产生堵塞问题、并且速度足以支持系统的连续运转的那些。膜的实例包括微孔膜，其孔径大小通常是 0.1 到 10 微米，可以将其制作为截留所有大于额定大小的颗粒。优选地，它们的材质是陶瓷的，用于本发明的微滤和 TFF。超滤膜具有较小孔径，并根据被截留的蛋白质的大小来表征。可以获得额定截留分子量从 1000 到 1000000 道尔顿的超滤膜。

超滤膜最适合用于本发明的工艺中。超滤膜通常是不对称的，在上游表面有一薄层或者皮层，该薄层是分离动力所需的。它们通常是从再生纤维素或者聚砜制备的。

用于切向流系统 80 的膜滤器根据将要处理的液体的量而可以以

不同构造单元出现，孔径大小也有多种。特别适宜用于本发明的、用于相对大规模的是那些已知的市售切向流过滤装置。

在变通的优选装置中，并且由于以上列出的原因，图 2A 的微滤装置 30 包含多个（优选为 2 个）过滤膜，分别为膜 56 和 57。这些膜以互相平行的构型放置。

本发明还涉及多阶段级联过程，其中来自上一个过程的滤出液在第二个切向流过滤装置中通过比第一个装置中的膜孔径小的过滤膜，来自这第二个过滤的滤出液被回收回第一装置中，然后该过程重复进行。

适宜本发明的工艺或者与微滤单元 30 联合使用的一种切向流系统 80 图示于图 2B 中。这里，第一容器 85 通过入口导管 90 与设置在过滤单元 95 内的过滤室 96 相连。第一输入抽吸装置 100 设置在第一容器 85 和过滤室 96 之间。过滤室 96 通过出口导管 110 与第一容器 85 相连。过滤室 96 被第一过滤膜 115 与在过滤装置 95 中位于其正下方的第一滤出液室 97 隔开。第一滤出液室 97 具有出口导管 98，其与室 97 的入口相连，在导管 98 处设置了滤出液抽吸装置 120。与出口导管 98 相连的导管 45 还与另一容器 120 相连。

该容器 120 通过入口导管 125 与另一过滤室 127 相连，过滤室 127 设置于第二过滤装置 130 中。第二输入抽吸装置 133 被设置于第二容器 120 与过滤室 127 之间。过滤室 127 被第二过滤膜 128 与在过滤单元 130 中位于其正下方的第二滤出液室 129 隔开。第二滤出液室 129 具有出口导管 135 与室 129 的入口相连，在导管 135 内设置了滤出液抽吸装置 140。与出口导管 135 相连的导管 125 还与第三容器 150 相连。

该容器 150 通过入口导管 155 与第三过滤室 157 相连，室 157 被设置于第三过滤装置 160 中。第三输入抽吸装置 165 设置于第三容器 150 和过滤室 157 之间。过滤室 157 被第三过滤膜 165 与在过滤装置 160 中位于其正下方的第三个滤出液室 159 隔开。第三滤出液室 159 具有出口导管 170 与导管 155 相连，导管 155 与第一容器 150 相连，使滤出液重复循环到原来的罐内。还提供了样品点 99 以及压力计 175 用于监控该过程。

本发明的工艺可很好地调试成用于商业规模。该工艺可以按照分批运行或者连续运行，或者以半连续的方式运行，即在连续流的基础上，将含有所需物质的溶液通过切向流滤器，直至整个大批被过滤，在不同的过滤阶段之间插入有清洗步骤。然后就可以处理新鲜的分批溶液。这样，可以进行连续的循环过程而在相对短的时间内获得大量的纯度可以接受的所需产物。

由这里描述的切向流过滤的独特性质以及其对含有固体的溶液提供连续过滤而不会出现滤器堵塞的能力得到了一种有高度优势的工艺，它可以连续地并在商用规模上分离和纯化生物反应产物。而且，该过程可以用于大范围内的生物分子，例如转基因来源的蛋白质产物、抗体、细胞碎片和细胞培养物裂解物。

以下的实施例进一步详细举例说明了本发明，但是这些实施例的目的并不是限制性的。在这些实施例中，所有参考文献中公开的内容均明确引入作为参考。

材料和方法

对于所有使用微滤系统进行的实验（除了供给与排放实验以外），使用以下的设备：

经过校准与泵相关的 601pm 泵（泵曲线）

1"OD 不锈钢清洁管道系统

0.2 微米孔径陶瓷膜，面积为 0.2 平方英寸或者 1.5 平方英寸
具有一个 1/2'' 物料出口的不锈钢清洁膜支架

1/4'' ID 弹性透过物管线

截留物管线上的隔膜阀

两个压力计

钢制的 1.2 升补料贮罐

3/4'' ID 弹性截留物管线

对于所有的双 TFF 实验，将前面的设备与以下的设备联合使用：

最大输出量为 800mlpm 的隔膜泵

所有管线上都有 1/4'' 弹性抗压力管材

一个压力计，用于测定补料液的压力

在截留物和透过物管线上的两个隔膜阀

30kDa 额定截留分子量的 PES Pall Filtron Centramate 膜，面积为 0.2 平方英寸或者 1 平方英寸

不锈钢的 Pall Filtron Centramate 膜支架

1 个不锈钢 U 型管与透过物出口相连

膜的选择

用于双 TFF 系统的膜选自一组具有不同几何形状和额定截留分子量的膜。以前的研究对多聚物材质的高截留分子量 UF 膜以及陶瓷材质的膜用于澄清步骤进行了考察。将乳汁浓缩两倍、然后进行双 TFF 对于所有的膜来讲都是挑战。然后对膜进行多次运行和清洁以分析膜的重复使用性。当膜的标准化水通量维持在未使用过的膜的 80%以上，则认为该膜已经再生而可以用于下一步的过程。没有一种平板型的多聚物膜盒在三次使用后仍然能够保持目标水通量回收率，而陶瓷材质的膜可以再生利用 60 次以上。这是由于可以用更为苛刻的条件即更高浓度的化学物质和更高的温度来清洁陶瓷之故。30kDa 超滤膜在 20 次循环后保持了高的水通量回收率。

用 0.2 微米额定截留分子量的陶瓷管状膜测试用于澄清乳汁并且使 IgG1 抗体通过的第一个单元。使用 30kDa 截留分子量的平板状超滤膜测试用于捕获 IgG1 抗体的第二个系统。

分析方法

对每个实验中的样品进行分析：用蛋白 A HPLC 分析 IgG 含量，用 SDS-PAGE 检查降解，用等电聚焦（IEF）检查修饰，用大小排阻层析（SEC）检查聚集情况。

步骤

使用 0.2 微米截留分子量的陶瓷微滤膜进行一系列的对照实验，期望理解工艺操作关系。测量产物通量（ J_p ），其与流速（ u ）、跨膜压力（TMP）、温度（ t ）和乳汁浓度（ c ）有关。一旦关系建立，则确定操作的最佳窗口，并且测试集成性工艺。取样并且收集质量平衡数据，分析最初产物产率和处理量。（请参见图 2A 和 2B）

温度实验

此目的是确定以最小的体积通过 0.2 微米、3 毫米管道的陶瓷微滤膜、得到最佳 IgG1 抗体通量时的操作温度范围。为了在处理过程中用 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析 IgG1 抗体的降解，在乳汁混和之前测定每个乳汁部分的 pH。将乳汁混入微滤补料罐中，记录总体积。这时微滤泵控制器的频率从 20 赫兹升高到 45 赫兹（大约 5L/min 升高到 20L）。记录每一个后继时间点的所有参数，例如温度、压力、交叉流速率、透过物流速和体积。重复循环运行该微滤环（路径 A）5 分钟。将跨膜压力调整为 12psig，再重复循环 5 分钟（路径 A，维持温度为 20 摄氏度）。使透过物管线通向排水道中，直至乳汁浓缩为原来的两倍（收集透过物）。温度维持在 20 摄氏度。从补料罐和透过物管线中取样品 2 和 3。然后将透过物管线返回路径 A，并重复循环 10 分钟。

取样品 4 和 5。使温度上升至 25 摄氏度。重复循环系统 10 分钟，然后取样品 6 和 7。使温度上升至 30 摄氏度。然后重复循环系统 10 分钟，取样品 8 和 9。使温度上升至 35 摄氏度。然后重复循环系统 10 分钟，取样品 10 和 11。使温度上升至 40 摄氏度。然后重复循环系统 10 分钟，取样品 12 和 13。关闭泵并在 2-8 摄氏度下储存样品，用于 IgG 的定量（样品 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 进行 SDS-PAGE，检查降解和聚集；样品 1 和 16 用 IEF 分析；样品 1, 3, 16, 17 用 SEC 分析）。

微滤乳汁浓缩实验

根据本发明的优选实施方案，本实验的目的是确定用最小的体积通过 0.2 微米、3 毫米管道的陶瓷微滤膜、得到最佳 IgG1 抗体通量时的起始乳汁浓度的范围。

在操作中，在乳汁混和之前，测量每个乳汁部分的 pH。将乳汁混入微滤补料罐中，记录总体积。这时将微滤泵控制器的频率从 20 赫兹升高到 45 赫兹（大约 5L/min 升高到 20L）。记录每一个后续时间点的所有参数，例如温度、压力、交叉流速率、透过物流速和体积。重复循环运行该微滤环（路径 A）5 分钟。将跨膜压力调整为 12psig，再重复循环 5 分钟（路径 A，维持温度为 20 摄氏度）。将跨膜压力调整为 15psig，重复循环运行（路径 A）5 分钟。使透过物的管线通向排水道中，直至乳汁浓缩，收集 550 毫升的透过物，然后将透过物管线返回路径 A（重复循环 10 分钟）。分别从补料罐和透过物管线中取样品 2 和 3。

将透过物管线通向路径 B，并向补料罐中加入 600 毫升乳汁。将透过物的管线通向排水道中，直至乳汁浓缩，收集 500 毫升的透过物，然后将透过物管线返回路径 A（重复循环 10 分钟）。分别从补料罐和透过物管线中取样品 4 和 5。然后将透过物管线通向路径 B，并向补料

罐中加入 500 毫升乳汁。将透过物的管线通向排水道中，直至乳汁浓缩，收集 500 毫升的透过物，然后将透过物管线返回路径 A（重复循环 10 分钟）。分别从补料罐和透过物管线中取样品 6 和 7。然后将透过物管线通向路径 B，并向补料罐中加入 380 毫升乳汁。将透过物的管线通向排水道中，直至乳汁浓缩，收集 400 毫升的透过物，然后将透过物管线返回路径 A（重复循环 10 分钟）。分别从补料罐和透过物管线中取样品 8 和 9。关闭泵并在 2-8 摄氏度下储存样品，用蛋白质 A 分析进行 IgG 定量；用 SDS-PAGE 和 Western 检查降解和聚集；用 SEC 检查聚集；经 IEF 检查等电点的改变。

流速和 TMP 实验

为了确定跨膜压力（TMP）、交叉流速度、滤出液澄清度、膜液体通量和 IgG1 抗体通过 0.2 微米、3 毫米管道的陶瓷微滤膜之间的关系，在 1 升非转基因乳汁中掺入 3.7 克 IgG1 抗体（2.5 g/L），将掺入后的乳汁置于 1.5 升的补料罐内。掺入后的乳汁在室温下一边连续搅拌一边通过微滤环被以 30L/min 的速率泵出，使用以下的起始参数：

膜面积：0.164 平方英寸

膜孔径大小：0.20 微米

起始乳汁体积：1.0 升

料液压力：10 psig

透过物压力：0 psig

料液速率：20L/min

乳汁温度：30 摄氏度

样品#1

该样品取自掺入后的乳汁。微滤的透过物管线返回补料罐内。在 10 分钟时，将透过物通向“路径 B”（透过物通向排水道）。这将使乳汁浓缩至 500 毫升。当乳汁的浓度是起始浓度的两倍时，将透过物返回路径 A（重复循环至补料罐内）。10 分钟的重复循环后，取样品

2 和 3, 然后调整返回压力阀, 使靠近泵的补料压力示数为 10psi。通过调整泵速度为 55 赫兹, 使补料流速保持在 13.35l/min。10 分钟重复循环后, 取样品 4 和 5, 然后调整返回压力阀, 使靠近泵的补料压力示数为 14psi。通过调整泵速度为 60.66 赫兹, 使补料流速保持在 13.35l/min。10 分钟重复循环后, 取样品 6 和 7, 然后调整返回压力阀, 使靠近泵的补料压力示数为 12psi。通过调整泵速度为 40 赫兹, 使补料流速调整至 7.75l/min。10 分钟重复循环后, 取样品 8 和 9, 然后调整返回压力阀, 使靠近泵的补料压力示数为 14psi。

通过调整泵速度为 43.45 赫兹, 使补料流速保持在 7.75l/min。10 分钟重复循环后, 取样品 10 和 11, 然后调整返回压力阀使靠近泵的补料压力示数为 10psi。通过调整泵速度为 48 赫兹, 使补料流速调整至 12.36l/min。10 分钟重复循环后, 取样品 12 和 13, 然后调整返回压力阀使靠近泵的补料压力示数为 14psi。通过调整泵速度为 55.44 赫兹, 使补料流速保持在 12.36l/min。10 分钟重复循环后, 取样品 14 和 15, 然后调整返回压力阀使靠近泵的补料压力示数为 20psi。通过调整泵速度为 61.69 赫兹, 使补料流速调整至 12.36l/min。10 分钟重复循环后, 取样品 16 和 17, 然后通过调整泵速度为 64.64 赫兹, 调整补料流速为 13.35l/min, 调整返回压力阀使靠近泵的补料压力示数为 20psi。10 分钟重复循环后, 取样品 18 和 19, 然后通过调整泵速度为 52.65 赫兹, 调整补料流速为 7.75l/min, 调整返回压力阀使靠近泵的补料压力示数为 20psi。10 分钟重复循环后, 取样品 20 和 21, 然后关闭泵。所有的样品冷藏保存, 用蛋白质 A 测定法确定总 IgG 含量。对透过物样品 (3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21) 目测检查澄清度。

双处理实验

为了在双 TFF 系统中测试在前面的实验中确定的工艺参数从非转基因乳汁中回收细胞培养物 IgG1 抗体的情况, 用 2.4 克的细胞培养物

IgG1 抗体掺入非转基因乳汁中，总体积为 1000 毫升，取 1 号样品。将掺入后的乳汁置于微滤系统的补料罐内，以 13.41/min 的速度泵出并跨过膜。在每个后续时间点记录温度、压力、透过物流速和体积。调整系统至以下的起始参数：

膜面积：0.2 sqft

膜孔径大小：0.20 um

起始乳汁体积.：1000 mL

跨膜压力：14 psig

透过物压力：0 psig

浓缩：1 x

使微滤的透过物管线返回至补料罐。在 10 分钟时，将透过物导入“路径 B”（引流透过物）。当乳汁浓缩至 500 毫升或当乳汁的浓度是起始浓度的两倍时，将透过物返回路径 A（重复循环回补料罐内）。按照以下的条件启动超滤泵：

膜面积：0.2 sqft

膜孔径大小：30kDa

起始体积.：500 mL

跨膜压力：7.3 psig

透过物压力：1.4 psig

浓缩：1 x

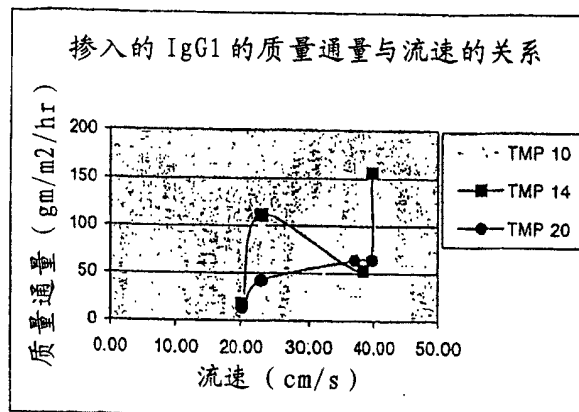
10 分钟重复循环后，调整超滤截留物和透过物的压力，使超滤的透过物流速与微滤的透过物流速相等。然后将超滤的透过物管线通向微滤的补料罐内，将微滤的透过物管线通向超滤的补料罐内，开始透滤。运行该系统共 326 分钟，对每一透滤体积都取样。所有的样品冷藏保存，用蛋白质 A 测定法确定总 IgG 含量，用 SEC 检查聚集。

使用 CHO 细胞产生的 IgG 抗体的实验显示跨膜压力为 14psig 时的

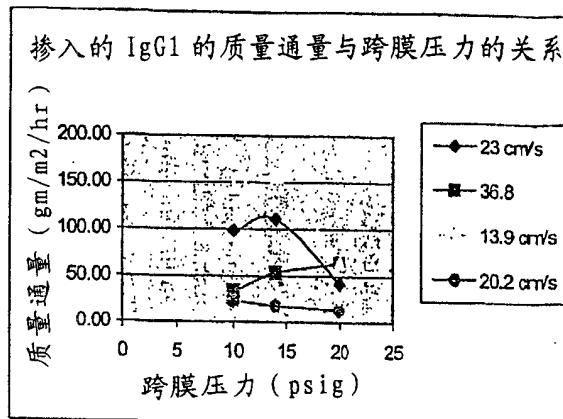
最佳流速为大约 23cm/s (图表 C 和 D)。但是含有目标蛋白质或者免疫球蛋白的料液可能来自任何能够产生这种分子的来源, 包括但是不限于产生外源重组蛋白的转基因动物。根据本发明的最适温度是 30-35 摄氏度之间 (图表 A)。非转基因乳汁显示液体通量在 1.5-2X 时最高 (图表 B)。当在双 TFF 系统中测试这些参数时, 得到了 82.3% 的产率 (图表 H)。使用来自山羊 C1017 的天然转基因乳汁重复流速和跨膜压力实验, 显示跨膜压力为 16psig 时最适流速为 40-45cm/s (图表 E 和 F)。在所发现的参数下对天然转基因乳汁使用 CHO 细胞表达的 IgG1 抗体进行的双 TFF 过程测试得到的产率为 64% (图表 G)。转基因山羊可以来自任何的哺乳动物, 优选来自有蹄类动物, 最优选来自山羊或者牛。

掺入研究:

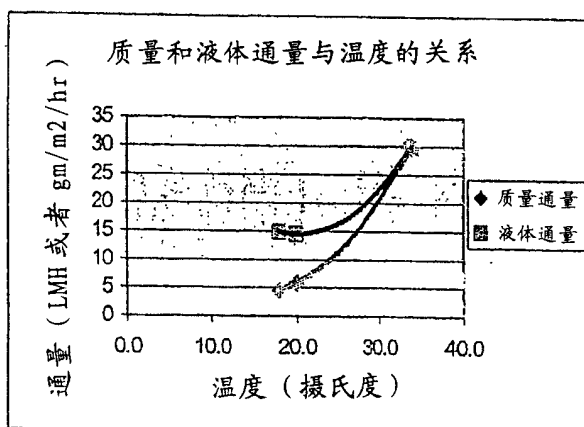
图表 A



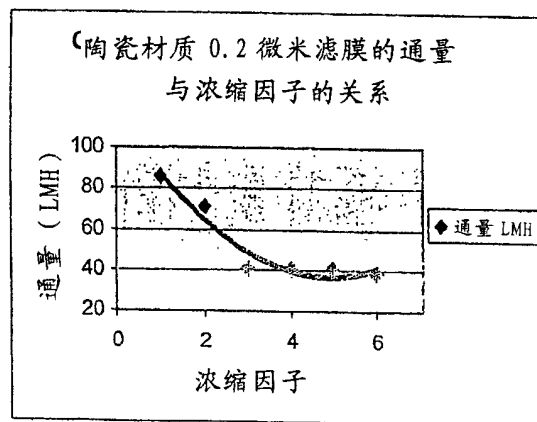
图表 B



图表 C

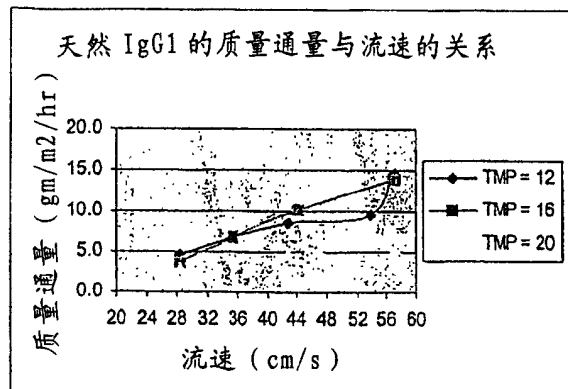


图表 D

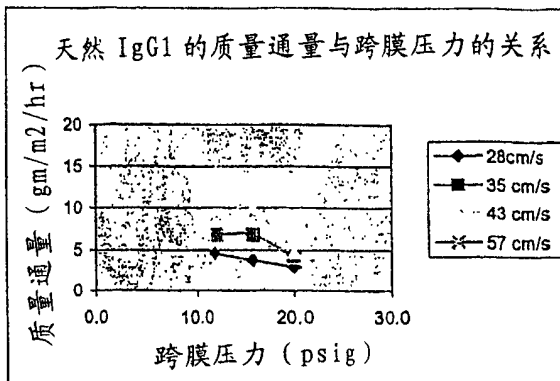


转基因乳汁:

图表 E

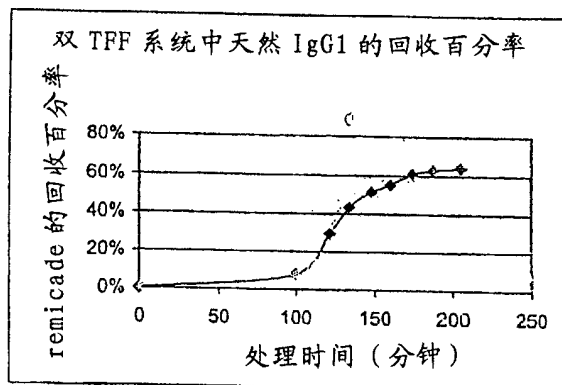


图表 F

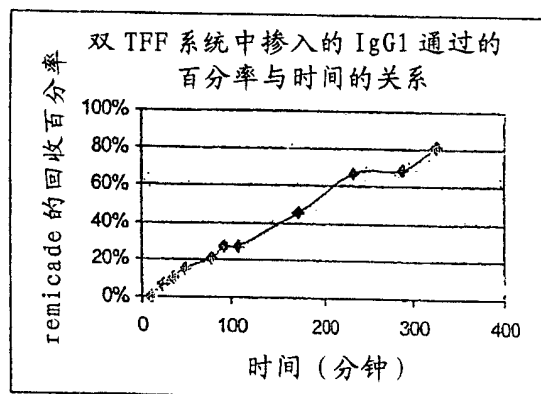


工艺测试

图表 G



图表 H



尽管向非转基因乳汁中掺入 CHO 细胞 IgG1 抗体对于 IgG1 抗体在乳汁中的行为有了初步的观察,含有 IgG1 抗体的天然分泌的乳汁在使用根据本发明优选使用的 0.2 微米的陶瓷材质膜时,需要对参数进行不同的优化。与转基因乳汁的研究相比,掺入研究显示了较低的最适流速和非常高的产物通量。而且,使用对转基因乳汁优化的参数运行双 TFF,对掺入 IgG1 抗体的天然非转基因乳汁得到的产物回收率更低。

切向流过滤(TFF)作为一种工艺而实施,它通过去除原料乳汁中的颗粒状物质如脂肪、酪蛋白微球和细菌而使乳汁基质中的 IgG1 抗体澄清和稳定。TFF 广泛用于生物技术和乳制品工业中,用于除去杂质和浓缩产物。为了根据本发明有效地使用 TFF,重要的是要选择适当的膜,对工艺参数(温度、跨膜压力、交叉流速度和乳汁浓度)进行优化以得到高产物通量,并开发出清洁和矩阵储存的步骤以保证膜具有较长的寿命。这里根据本发明描述了实验性矩阵,并且将其用于转基因山羊乳汁以确证前面的操作参数。对膜的清洁和储存条件也进行了研究。还开发出了一个无菌过滤步骤以除去在 TFF 过程完成之后仍然存在于含有目标蛋白的澄清化乳汁产物中的任何细菌。然后将工艺信息传送到中试规模的设备中,进行最初的工程运转。一些工艺设计标准包括不使用添加剂以防止对注射用水的需求、长的滤膜寿命、高产率以及短的处理时间。本发明的工艺优选地被设计为可以针对中试和生产操作而被放大。

工艺描述

为了使用 0.2 微米的陶瓷材质微滤膜和 30kDa 超滤膜进行双 TFF,对来自山羊 D035 的转基因乳汁进行澄清和浓缩,用 0.1M 氢氧化钠对系统进行清洁。然后必须将乳汁混和并提高温度至 15-20 摄氏度。必须通过收集陶瓷膜的透过物而将乳汁在微滤系统上浓缩至其原有体积的一半。微滤必须在 141pm 的交叉流速率和 15psi 的跨膜压力下运行。温度必须保持在 27 摄氏度或者左右。然后必须在 1.6-21pm 的交叉流

速率下启动超滤系统。必须调整超滤的截留物和透过物的压力，使超滤的透过物流速与微滤的透过物流速相匹配。一旦超滤的透过物流速与微滤的透过物流速相匹配，必须将两个系统相偶联以使微滤的透过物管线通向超滤的补料罐中，而超滤的透过物管线通向微滤的补料罐中。两个系统必须偶联运行 5-6 个透滤体积。一旦透滤完成，将两个系统分开，关闭微滤系统，排空并且清洁，将超滤的透过物通向排水道直至超滤补料罐内的半成品澄清浓缩液的体积降低一半，使总浓度提高 4 倍。然后排空超滤系统，对半成品澄清化浓缩物进行无菌过滤，并清洁超滤系统。两个系统都保存在 0.1M 氢氧化钠中。工艺示意图在图 1 中提供。

膜的选择

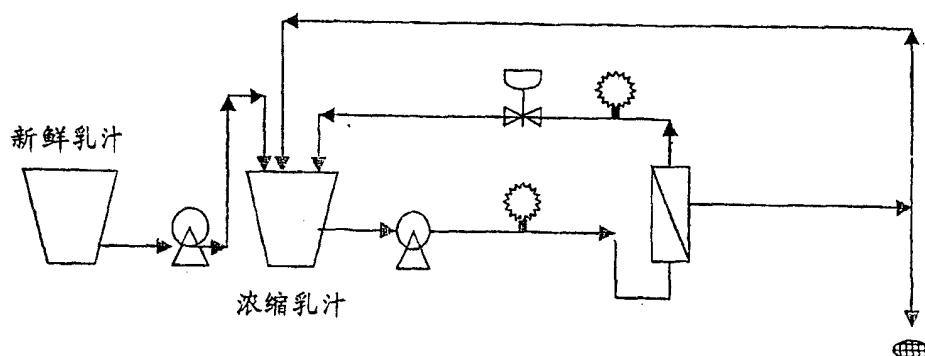
根据以前的研究，使用 0.2 微米标称的陶瓷管状膜，对用于澄清乳汁和通过 IgG1 抗体的第一个装置进行测试。使用 30kDa 截留分子量的平板状超滤膜对用于捕获 IgG1 抗体的第二个系统进行测试。对于使用 D035 乳汁的每个实验中的样品进行分析，分析项目包括用蛋白质 A HPLC 分析 IgG 含量，用 SDS-PAGE 检查降解，用等电聚焦检查修饰，用大小排阻层析（SEC）检查聚集。确定用最小的体积通过 0.2 微米、3 毫米管道陶瓷微滤膜、得到最佳 IgG1 抗体通量时的起始乳汁浓度范围。在处理过程中用 SDS-PAGE 和 Western 印迹检查 IgG1 抗体的降解，以测定浓缩步骤对于 IgG 抗体产生的影响（如果有的话）。完成两个实验以研究乳汁浓度，包括一次用非转基因乳汁运行的实验和一次用转基因乳汁运行的实验。

非转基因补料与排放实验

由于可以获得非转基因乳汁的充足供应，所以使用非转基因乳汁分析在使用 0.2 微米陶瓷微滤膜浓缩时液体通量的衰减。用于该实验的设备与微滤实验中描述的设备相同，但是添加了第二个补料罐以及料液泵，以便将乳汁运送到微滤系统的补料罐中，运送速率与透过物

从膜流出的速率相同。设备的示意图如下：

图表 1



如在图表 I 中看到的，用 1500 毫升的乳汁填充补料罐，泵开始的速率是 45 赫兹。在没有截留物压力的情况下重复循环系统 10 分钟。记录所有的参数。然后将截留物的压力提高到 10psig，跨膜压力为 11psig。通过调整截留物阀门而在整个实验中维持该跨膜压力恒定。将透过物导入到排水道中，启动第二个泵，将新鲜的乳汁泵入到补料罐内，泵入的速率与透过物流出的速率相同，使得补料罐内的体积保持恒定。每隔 5-10 分钟记录所有的参数，调整第二个泵的速度使补料罐内的乳汁水平保持恒定。实验一直进行到乳汁被浓缩 5.37 倍或者 82%。

转基因乳汁浓度与产物通量

测量 D035 每一次产奶的 pH 和体积，并且记录于 pH 表格中。合并 D035 的 RM01-001PD 到 RM-004PD 部分的乳汁，总体积为 3 升。从其中取样 F1，将 1500 升倒入补料罐内。启动泵，将速度从 20 赫兹增加到 45 赫兹（大约 5LPM 到大约 20L）。记录温度、压力、交叉流速率、透过物流速和体积。在每个后继时间点记录所有的参数。重复循环运行该系统（路径 A）5 分钟。调整跨膜压力到 12psig，重复循环（路径 A）5 分钟。将透过物管线通向排水道直至乳汁浓缩 1.5 倍，收集

550 毫升的透过物。分别从补料罐和收集的透过物中取样 F2 和 P1。将透过物管线返回路径 A，重复循环 10 分钟。分别从补料罐和透过物管线中取样 F3 和 P2。之后向补料罐内加入 500 毫升新鲜乳汁，将透过物通向路径 B 以将乳汁浓缩至 2 倍，收集 500 毫升的透过物。将透过物管线返回路径 A，重复循环 10 分钟。分别取样 F4 和 P3。重复上述过程，将乳汁浓缩至 2.5 倍和 3 倍，继续取样。关闭泵。将样品储存于 2-8 摄氏度，用于 IgG 定量和 SDS-PAGE 分析。

确定以最小的体积通过 0.2 微米、3 毫米管道陶瓷微滤膜、得到最佳 IgG1 抗体通量时的操作温度范围。由于处理造成的 IgG 抗体的降解由 SDS-PAGE 分析。由 IEF 追踪同 I 型的修饰。测量山羊 D035 每一次产奶的 pH 和体积，并且记录于 pH 表格中。合并 D035 的 RM01-005PD 到 RM01-008PD 部分的乳汁，总体积为 3000 毫升。从混合物中取样 F1。将 2 升倒入补料罐内。启动泵，将速度从 20 赫兹增加到 45 赫兹（大约 5LPM 到大约 20L）。记录温度、压力、交叉流速率、透过物流速和体积。在每个后继时间点记录所有的参数。重复循环运行该系统（路径 A）5 分钟。调整跨膜压力到 12psig，重复循环（路径 A）5 分钟。保持温度为 20 摄氏度。将透过物管线通向排水道直至乳汁浓缩 2.5 倍，收集 800 毫升的透过物。分别从补料罐和收集的透过物中取样 F2 和 P1。将透过物管线返回路径 A，继续重复循环，降低 TMP 至 2psi，泵的速度降低至 28 赫兹（17LPM）运行 17 分钟，使温度降低到 23 摄氏度。将泵的速度和 TMP 分别提高至 45 赫兹和 15psi，在 24 摄氏度下重复循环 5 分钟。取样 F3 和 P2。将温度提高至 27 摄氏度，乳汁重复循环 5 分钟，取样 F4 和 P3。在 29 摄氏度和 36 摄氏度重复上述步骤。剩余的新鲜乳汁通过微滤膜澄清。关闭泵。样品储存于 2-8 摄氏度，用于 IgG 定量、IEF 和 SDS-PAGE 分析。

流速和 TMP 与产物通量

确定通过 0.2 微米、3 毫米管道陶瓷微滤膜、得到最佳 IgG1 抗体

通量的跨膜压力 (TMP) 范围和交叉流速度范围。测量 D035 每一次产奶的 pH 和体积, 并且记录于 pH 表格中。合并 D035 的 RM01-009PD 到 RM01-0012PD 部分的乳汁, 总体积为 3700 毫升。从混合物中取样 F1。将 1 升倒入补料罐内。启动泵, 将速度从 20 赫兹增加到 45 赫兹 (大约 5LPM 到大约 20L)。记录温度、压力、交叉流速率、透过物流速和体积。在每个后继时间点记录所有的参数。重复循环运行该系统 (路径 A) 5 分钟。调整跨膜压力到 12psig, 重复循环 (路径 A) 5 分钟。将透过物通向排水道直至乳汁浓缩 2 倍, 收集 500 毫升的透过物。分别从补料罐和收集的透过物中取样 F2 和 P1。将透过物管线返回路径 A, 继续重复循环 10 分钟。取样 4 和 5。调整跨膜压力为 10psig, 通过提高泵速至 38.81 赫兹 (大约 14LPM) 来维持补料流速。乳汁通过微滤系统重复循环 10 分钟, 然后取样 P3。根据以下的表格重复该步骤:

截留物流速 (LPM)	泵速度 (Hz)	跨膜压力 (psig)	样品号 (ID)
14	38.81	10	P2
14	45.86	15	P3
12	35.96	10	P4
12	47.03	15	P5
8	30.26	10	P6
8	37.63	15	P7
16	41.66	10	P8
16	48.37	15	P9
16	54.19	20	P10
14	51.44	20	P11
12	48.68	20	P12
8	43.17	20	P13

关闭泵。将样品储存于 2-8 摄氏度, 用于通过蛋白 A 定量而进行 IgG 定量、IEF 和 SDS-PAGE 分析。

工艺测试

为了澄清 D035 乳汁, 使用双 TFF 系统, 使用面积为 1.5 平方英寸的 0.2 微米陶瓷微滤膜, 将微滤透过物补料 30kDa、1.0 平方英寸的 30kDa 超滤膜, 在每一个透滤体积时对 IgG 抗体的回收进行分析。测量山羊 D035 每一次产奶的 pH 和体积, 并且记录于 pH 表格中。合并山羊 D035 的 1776-032601-01-B RM01-029PD-RM01-032PD 部分和 RM01-033PD-RM01-036PD 部分的乳汁, 总体积为大约 4 升, 用于每一次实验。从混合物中取样 F1。将 1500 毫升倒入补料罐内。启动泵, 将速度从 20 赫兹增加到 45 赫兹 (大约 5LPM 到大约 20L)。记录温度、压力、交叉流速率、透过物流速和体积。在每个后续时间点记录所有的参数。重复循环运行该系统(路径 A)5 分钟。调整跨膜压力到 15psig, 重复循环(路径 A)5 分钟。将透过物管线通到量筒中。随着补料罐内体积的下降, 加入新鲜乳汁。收集透过物, 直至乳汁浓缩 3 倍, 收集到 2700 毫升。分别从微滤补料罐和收集的透过物中取样 F2 和 P1。再次将透过物管线返回路径 A。将交叉流速率和跨膜压力分别提高到 14LPM 和 15psig。启动超滤系统, 交叉流速率为 0.8LPM, 料液压力为 11psi。每一个系统同时重复循环 10 分钟。将超滤透过物引到排水道中, 收集 800 毫升的透过物。测量微滤的透过物流速。调整超滤系统上的截留物和透过物压力, 使透过物流速与微滤系统的透过物流速相等。将微滤系统的透过物通向超滤系统的补料罐中, 而将超滤系统的透过物通向微滤系统的补料罐中。计算透滤时间(参考计算部分)。在每一次透滤结束时取样。测量透过物流速并重新计算透滤时间。进行 7 个透滤体积。分开两个系统, 关闭微滤系统。将超滤的透过物引入排水道中, 使澄清化的乳汁浓缩到总浓缩倍数为 4 倍。然后关闭超滤系统。样品储存于 2-8 摄氏度下, 用于 IgG 定量、IEF、SEC 和 SDS-PAGE 分析。从系统中取出澄清过的浓缩超滤截留物, 无菌过滤, 2-8 摄氏度储存。

膜的清洁

使用严格的清洁程序以保证每次循环都有高的水通量回收。将清洁步骤设计成模拟乳制品工业中标准的膜清洁步骤，也考虑到了生物制药实践的一些方面。对水冲洗步骤进行优化，以使用水量最小，同时将残留的化学物质冲走，达到适当的 pH 和电导值。在每次工艺步骤之后进行以下的清洁步骤，如以下的表 1 和 2 所示：

表 1
陶瓷膜清洁步骤

	步骤	浓度	体积	时间	温度	pH
1)	水冲洗	-	16-20L	5 分钟	60 °C	7.0
2)	NaOH 洗涤	0.5 M	1	10 分钟	60	>11.5
	次氯酸钠	400 ppm				
4)	NaOH 洗涤	0.5 M	1	30 分钟	60	>11.5
	次氯酸钠	400 ppm				
5)	水冲洗	-	20-25	5 分钟	60	7.0
6)	柠檬酸洗涤	0.4 M	1	30 分钟	60	<2.75
7)	水冲洗	-	16	10 分钟	60	7.0
8)	次氯酸钠	300 ppm	1	15 分钟	60	
>9.5	NaOH	0.05 M				
9)	水冲洗	-	12	10 分钟	60	7.0
10)	NaOH 储存	0.1 M	1		20	10-12

表 2

30kDa PES 膜清洁步骤

	步骤	浓度	体积	时间	温度	pH
1)	USP 水冲洗	-	2L/sqft		35 °C	5.0
2)	NaOH 冲洗	0.5 M	2L/sft		35	>11.5
	次氯酸钠	250ppm				
4)	NaOH 洗涤	0.5 M	2L/sqft	60 分钟	35	>11.5
	次氯酸钠	250 ppm				
5)	USP 水冲洗	-	4L/sqft		35	7.0
6)	柠檬酸洗涤	0.4 M	2L/sqft	60 分钟	35	
<2.75						
7)	USP 水冲洗	-	4L/sqft		35	7.0
10)	NaOH 储存	0.1 M			35	10-12

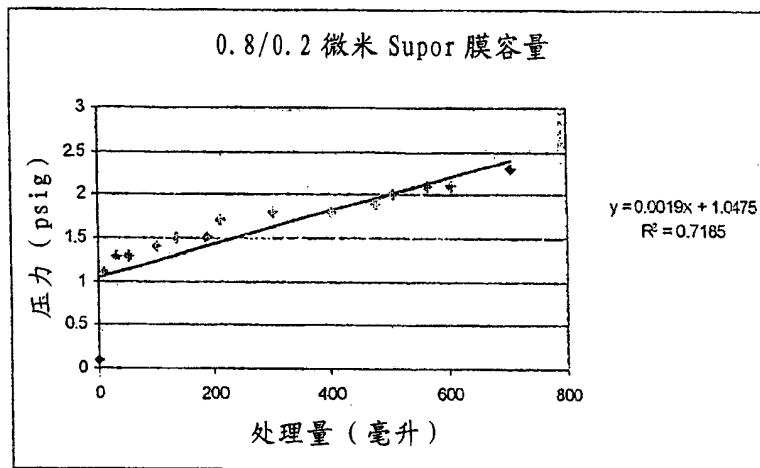
在第一次使用膜以前，针对跨膜压力、温度和水通量制作标准化的透水性曲线。在实验中使用膜之前，要检查标准化的水渗透性使其保持最少 80% 的水通量回收率。在开发中，陶瓷膜保持了 95-105% 的回收率，而 30kDa PES 膜保持了 80-90% 的回收率。

无菌过滤

如下面的图 J 所示，Pall Gelman Inc. 制备了除菌滤器，由 Supor 膜制成，其中有 0.8 微米的前滤膜与 0.2 微米的滤膜组合在套盒中。这些套盒的面积为 200 平方厘米，这是小盒型式的用于除菌过滤的最小膜面积。进行实验以确定每个小盒的过滤容量。用双 TFF 澄清非转基因乳汁，制备大量的澄清化乳汁，它可以模拟无菌处理过程中的料液。将 37 毫米的盘状 Supor 膜装在不锈钢的正常流支架上，并装配数字压力传感器和蠕动泵。用 USP 水冲洗整个系统使膜润湿并且检查是否有渗漏。然后将澄清的非转基因乳汁以恒定的流速泵入该系统中，定时记录压力。将数据拟合成直线，在下面的图表中该直线将处理量

与压力联系起来。由于在 30psig 压力时膜会被堵住，所以用外推法计算 30psig 时的处理量，以确定容量。对于 37 毫米的膜推算出的处理量为 7343 毫升，所以 200 平方毫米的盒，处理量估计为 131 升。

图表 J:



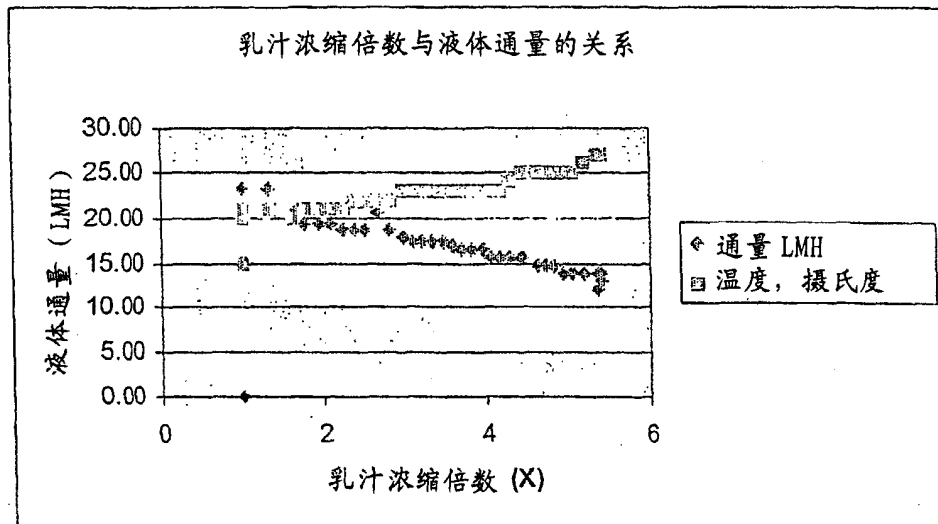
膜的储存

当膜的清洁方案确定以后，就可以测定储存条件。在清洁 48 小时后将膜储存于水中或者 0.1N 氢氧化钠中。将储存溶液漂洗掉，检查 NWP，并与清洁后的 NWP 相比较。储存之后两个 NWP 的变化都在储存之前 NWP 的 10% 以内。由于 0.1N 氢氧化钠可以抗细菌和真菌，NWP 在储存中没有下降，所以选择 0.1N 氢氧化钠作为储存剂。

浓缩与产物通量

几乎在浓缩刚开始时液体的通量就开始下降，在整个实验中通量持续平缓下降。最后几个点显示出由于膜污染而通量出现急剧下降。为了在处理过程中保持最适的液体通量，同时使用足够低的体积进行操作以便有合理的透滤时间，所以推荐 1.5 到 3 倍的乳汁浓缩。

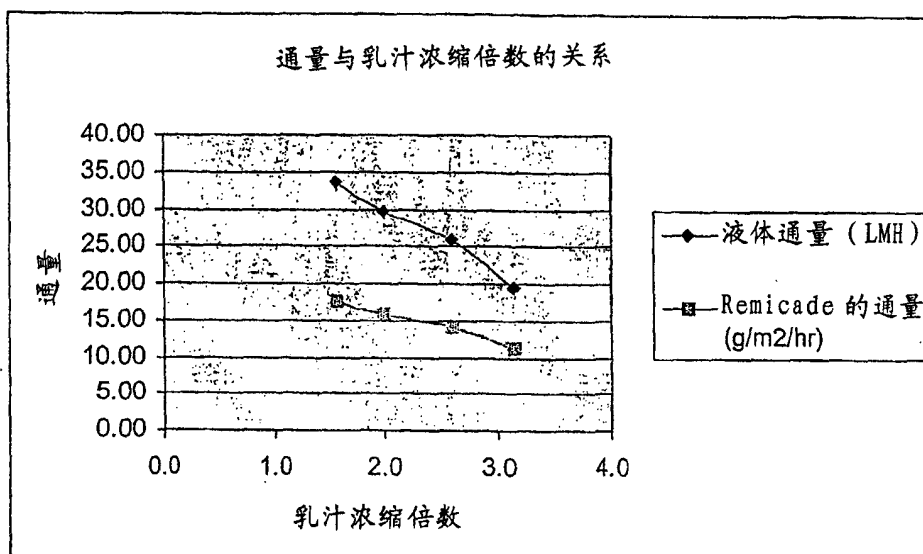
图表 K:



转基因乳汁

通过蛋白质 A HPLC 对 IgG 进行定量, 显示 IgG1 抗体和液体通量随乳汁的浓缩而稳步降低。从下面的图表 L 可见, 在运行双 TFF 时, 1.5 到 2.5 倍浓缩是合理的。SDS-PAGE 显示没有由于乳汁浓缩而出现聚集或者降解。

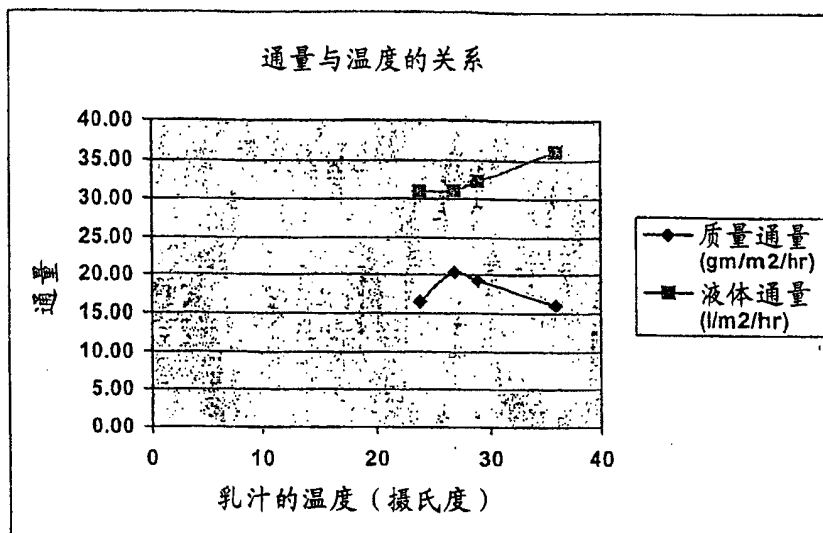
图表 L:



温度与产物通量

通过微滤膜的 IgG1 抗体质量通量在 27 摄氏度时达到最大，为 20.3 克/平方米/小时，如下面图表所示。最适的操作范围是 26-29 摄氏度。参考下面的图 M，IEF 显示未出现由于处理而造成的 IgG1 抗体同 I 型的修饰。对于乳汁样品，SDS-PAGE 不能提供信息；而澄清过的乳汁样品则显示有降解条带出现。这些降解条带在 D035 的初始乳汁样品中存在，在经 TFF 的澄清后半成品材料中条带变浅。

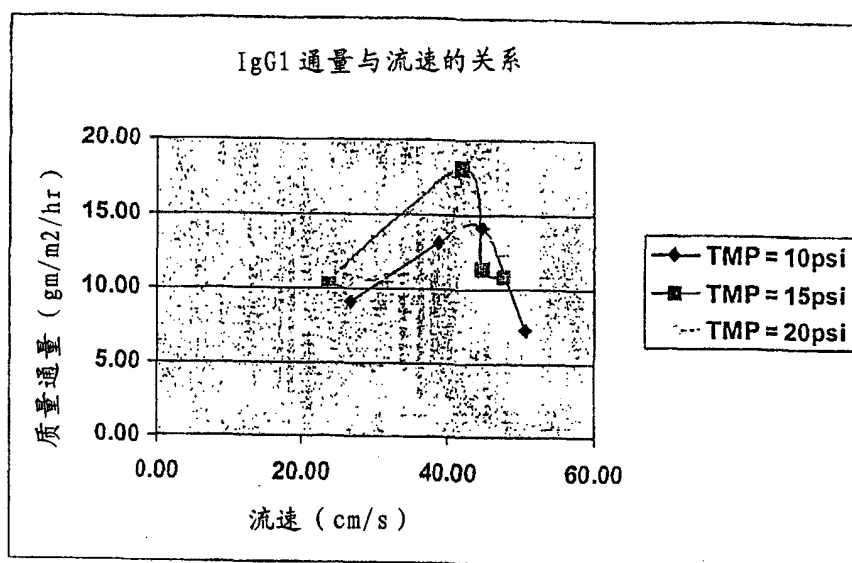
图表 M: 通量与温度的关系



流速、温度与产物通量

对于每一个 TMP 有一个最适的流速，但是在 TMP 为 15psi、流速为 42cm/s (14lpm) 时，IgG1 抗体通量是整体最高的。下面的图显示了在每个跨膜压力下流速的影响曲线。IEF 检查未发现由于处理造成的同 I 型的改变，SDS-PAGE 显示了与前一实验相似的结果。

图表 N:



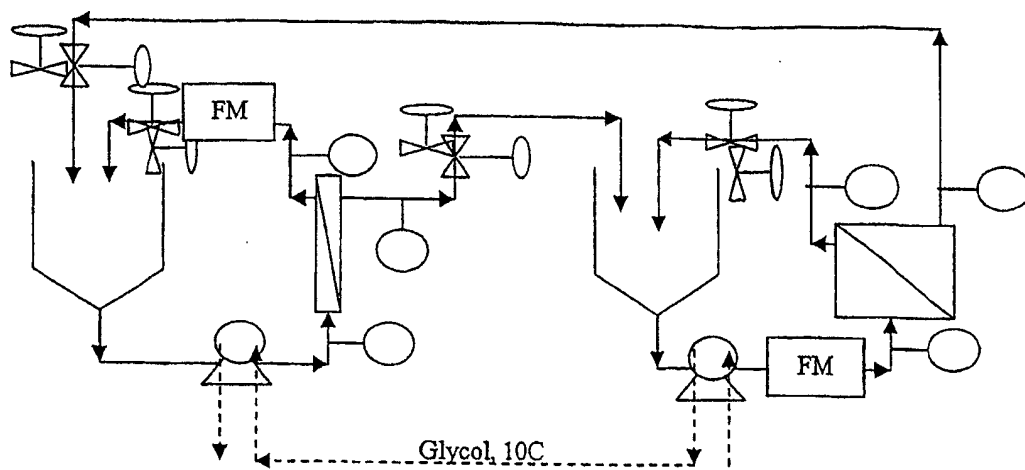
如图 N 所示, 第一个工艺测试显示了从乳汁混合物中总的 IgG1 抗体回收率为 81%。但是其中有 20%是聚集的。在澄清结束时的 IEF 条带与初始乳汁混合物的 IEF 条带看起来相同。而且取自中间透滤体积的样品显示了非常低的 IgG1 抗体浓度, 表明样品取自超滤补料罐内未混和的区域。重复该实验。

第二个工艺测试显示 IgG1 抗体的回收率为 90%, 只有 $5\% \pm 0.5\%$ 的 IgG1 抗体发生聚集。IEF 凝胶显示未出现由于处理造成的同 I 型修饰。SDS-PAGE 显示了轻微的聚集和降解条带, 但是这些条带并不意味着聚集或者降解的蛋白占据明显的百分比, 因为在最终的样品中通过大小排阻层析测定有 96.2%为单体。由于低的 IgG1 抗体起始浓度, 用于 IgG 定量的蛋白质 A 测定使得确定回收 IgG1 抗体所需的透滤次数变得很困难。六次透滤后的回收率为 90%, 但是五次透滤后通过蛋白质 A 测定的回收率为 170%。因此五到六次的透滤很可能对于回收 IgG1 抗体来讲已经足够了。

在中试厂房中使用的设备上进行了几次工程运行以澄清乳汁之后, 确定需要对设备和步骤进行修改以稳定地生产澄清的乳汁。将设备从中试厂房的 GMP 环境中移到开发实验室中, 进行大量的测试。对

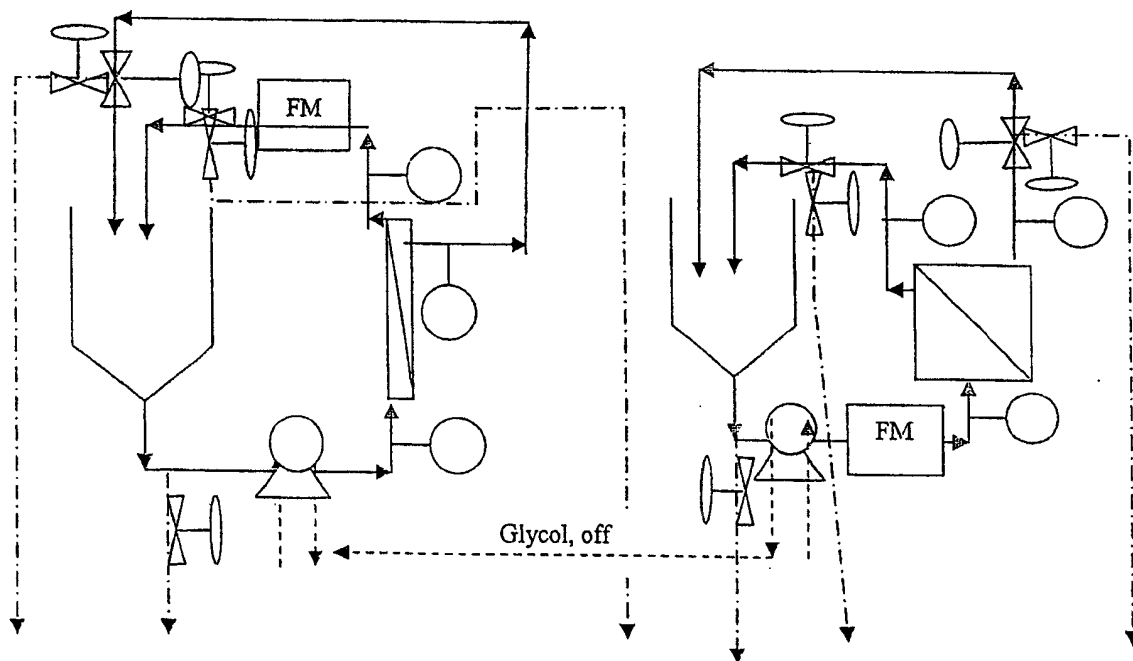
于系统的改变包括减少透过物的运输以及改变系统中阀门的位置，使得在清洁和消毒步骤中的漂洗更加便利。对清洁方案作少量改动，以改进清洁效率并降低耗水量。确定了工艺温度范围。最后在 GMP 记录中更加明确工艺的参数。

中试设备的原始设计完全使用的是不锈钢。该设计清洁起来非常麻烦，因为有许多很长的管道需要进行拆卸，从工艺处理的组装方式变为清洁阶段的组装方式。由于超滤透过物管道的长度和内径，在清洁方案中，这些管道不能被有效地清洁或漂洗。在微滤系统中加入一些部件以有助于清洁，但是这些部件的搭建会导致残渣累积的死空间。通过用 1/4'' 内径的管道代替长的超滤透过物管道，消除了这些问题。改变清洁设置，使微滤膜上面的出口可以用于清洁膜的透过物一端，这样就不需要其他的部件了。超滤的透过物管道在清洁过程中仍然保留在超滤系统上。而且在系统的微滤部分上安装有大型的热交换器，使微滤的温度可以被更精细地控制，但是这样就不能将超滤部分的温度控制在工艺要求的正确范围内。将热交换器从系统中移走，调整冷却器的设置，以便将两个系统都冷却到正确的温度范围内。最终的设计如下。用于储存、消毒和处理而装配的设备。在本发明的一个优选实施方案中的设备配置如下面的图 O 和 P 所示。



用于清洁装配的设备

上图为图 O，下图为图 P



对设备还有其他简单的改动。在使用水对超滤系统进行测试以确定妨碍足够的跨超滤膜交叉流的高压产生的原因之后，发现膜向下的扭矩过大，适宜的扭矩是 60 英寸·磅。泵的转子和密封垫也有脱落。向超滤膜上游的管线中插入 80 目滤网垫片，截获大的脱落物，防止流动限制和超滤膜上压力的积聚。移动超滤截留物阀，使其与超滤补料罐相邻。在处理过程中连接微滤透过物阀门和超滤补料罐的卷筒 (spool piece) 被去掉，使阀门与补料罐直接相连。这些改动使设备在清洁步骤时更易清洁和漂洗，并使得整个系统在消毒和接下来的漂洗以及洁净水透水性测试中保持为工艺处理模式的连接状态。

工艺过程改变

对 TFF 操作 SOP 和处理含 IgG1 抗体的乳汁的批记录进行修改，使其包括交叉流速率、跨膜压力以及微滤和超滤系统温度的范围。通过一系列实验确定温度范围。研究的参数以及产生的澄清乳汁的质量在下面的表 3 中予以概述。HEX 指的是在微滤系统上使用热交换器。比较最后三次运行 (5-7) 时温度范围的图表在附录 B.1 中。

表 3 工艺过程改变

运行	笔记本页码	HEX (y/n)	MF 温度范围 (°C)	UF 温度范围 (°C)	冷却器 SP (°C)	质量
1	137-151	Y	22	30	22	混浊
2	152-156	N	25-29	22-27	20, 15	清澈
3	157-160, 173	N	25-30	24-28	15	清澈
4	162-162	N	20-30	23-29	15	混浊
5	169-172	N	20-26	21-24	10	清澈
6	176-179	N	20-26	21-24	10	清澈
7	N/A	N	20-27	21-24	10	清澈

在中试设备上进行的所有工程操作产生的都是模糊或者混浊的澄清化乳汁。在过高的温度下操作会使澄清化的乳汁看起来模糊并且颜色几乎为绿色，而不是看起来清澈且呈黄色。高温处理可能导致乳汁中一般情况下被截留的多种分子通过微滤膜，并且可能会影响 IgG1

抗体的稳定性。当工艺过程在合适的交叉流速率以及跨膜压力下运行时,泵并不会导致温度升高到在工程运行中所见到的无法控制的情况。澄清化乳汁中的模糊物质还可能是由于在一些运行的清洁中不正确的冲洗留下的化学物质残留,样品的 pH 经测定为 9 (正常为 6.7)。通过调整设备和清洁步骤,充分地将化学物质从系统中冲走,这可以通过测定所有液流中漂洗水的 pH 和电导率而看出。

在过低的温度下操作会使澄清化的乳汁看起来混浊,且有白色的絮状物质均匀分布在乳汁中。在微滤系统中安装热交换器时,温度很容易控制,但是澄清化的乳汁仍然混浊。根据 P.F.Fox and P.L.H. McSweeny (1998) 的 Dairy and Biochemistry,酪蛋白在其等电点时是不溶的,而且不溶性的范围随着温度的升高而增大。这提示在较高的温度下进行微滤比在较低的温度下进行微滤能够除去更多的酪蛋白,而且微滤操作的温度比超滤操作低会使得通过微滤的处于溶解状态的酪蛋白在更为温暖的超滤过程中变得不溶。SDS-PAGE 确证了这个现象,显示与在实验规模运行 (bench scale run) 和成功的中试运行中制备的澄清化乳汁相比,在低温下进行的运行产生了过量的酪蛋白 (下图)。因此需要在维持高度酪蛋白不溶性和最低的可能温度之间找到一个平衡。根据所进行的运行,在 22 摄氏度下进行微滤则温度太低,在 30 摄氏度下进行运行则温度又太高。在运行的大部分过程中保持微滤的运行温度在 25 摄氏度附近可以重复产生出清澈的澄清化乳汁。图 3 中提供了 SDS-PAGE 凝胶比较。请参考图 3。泳道 1 是分子量标准。泳道 2 是细胞培养物 IgG1 抗体。泳道 3 是 2001 年 4 月 17 日进行的工程运行的最终澄清半成品。泳道 4 是中试运行 6 (合适温度) 的最终澄清半成品,泳道 5 是实验性 TFF 得到的澄清化半成品物质。与中试运行 6 和实验性澄清化物质的样品相比较,工程运行样品显示出多得多的酪蛋白。

清洁和消毒的改变

进行的设备改变使清洁和消毒方案也必须改变。在上表中，每次运行之后都运行清洁方案。需要使微滤上的截留阀保持半开放，以便于每一漂洗步骤中能够恰当地漂洗，原因是在阀和补料罐之间有一段长的死端。在第4次运行之后，运行清洁方案，跟踪水的消耗（笔记本10586）。在该实验中使用的水在第5、6和7次运行后得以证实，并且推荐在GMP工艺过程中使用。正如前面所陈述的，设备的改变可以使整个系统以工艺处理模式进行消毒。对此进行了检测。也测定了将消毒剂从漂洗系统中洗掉所需的USP水。

操作

使用双TFF进行乳汁处理所采取的实际步骤在下面的部分中予以描述。这些包括从系统消毒到工艺处理、清洁以及储存的整个过程。在开发实验室中第5-7次运行过程中在设备上使用了这些步骤，产生了清澈的澄清化乳汁。

消毒

为了使用0.2微米陶瓷微滤膜和30kDa超滤膜进行双TFF，以便对来自D035的转基因山羊乳汁进行澄清和浓缩，必须使用0.1M氢氧化钠对系统进行消毒。设备如上组装用于消毒和工艺处理。用USP水制备2升的0.1M氢氧化钠，将其泵入每个系统中，在微滤上的交叉流速率是15lpm，在超滤上的交叉流速率是1lpm。对于微滤不施加任何的截留物压力，而对于超滤的截留物施加5psi的压力。透过物阀门完全打开，使氢氧化钠在整个系统中反复循环。反复循环进行15分钟，然后通过罐和泵之间的排放阀使氢氧化钠溶液完全排出系统。在需要时，用USP水完全充满补料罐，漂洗整个系统。从每一个排放阀中排出1升水。微滤上的截留物阀门半关闭，将透过物阀门完全通向排废管。超滤上的截留物和透过物阀门也完全通向排废管。用12升超纯水通过微滤截留物管道进行冲洗，交叉流速率为20lpm。用4升超纯水通过微滤透过物管道进行冲洗，交叉流速率为15-20lpm，TMP为

6-8psi。用 7 升超纯水通过超滤的截留物和透过物管道进行冲洗，交叉流速率为 11pm，然后再用 3 升水冲洗透过物管道。

使用超纯水(如果需要的话加入更多)，抽吸微滤，速率为 201pm，提高截留物压力直至 TMP 达到 15psi，而不施加透过物压力，然后通过改变抽吸速度调整交叉流速率至 151pm。记录温度(必须在 25-28 摄氏度之间)、压力和交叉流速率。测量透过物通过透过物排空阀门的流速。在超滤上使用 11pm 的交叉流速率和 5psig 的截留物压力，不施加透过物压力(TMP 大约为 10psig)，重复上面的过程。比较透过物速率与膜在使用前的透水性。如果流出速率小于起始值的 80%，则或者重新清洁膜或者将它们换掉。

乳汁处理

乳汁必须合并并提高温度至 15-20 摄氏度。在微滤罐内合并乳汁，然后关闭微滤的透过物阀门，打开截留物阀门，打开泵，使交叉流速率为 201pm。5 分钟后取起始乳汁样品。然后提高压力至 TMP 达到 15psig，交叉流速率为 151pm。重复循环一直进行至乳汁温度达到 20 摄氏度。然后打开冷却器，调至 10 摄氏度，打开微滤的透过物阀门，通过收集陶瓷膜的透过物，在微滤系统上使乳汁浓缩至其起始体积的一半。在 151pm 交叉流速率和 15psi 跨膜压力下运行微滤。微滤的温度应该提高并且保持在 26 ± 2.0 摄氏度。然后必须启动超滤系统，交叉流速率为 0.8-1 lpm/sqft。通过透过物阀门测量每个膜的透过物流速。必须调整超滤的截留物和透过物的压力，使透过物的流速与微滤的透过物流速相匹配。当超滤的透过物流速与微滤的透过物流速相匹配时，应该在偶联状态下运行系统 5-6 个透滤体积。一旦透滤完成，即将系统分离，关闭微滤，排空并且清洁，将超滤的透过物排入排水管道内，直至超滤补料管内的半成品澄清化浓缩物的体积降低了一半，总的浓缩倍数为 4 倍。然后排空超滤，无菌过滤半成品澄清化浓缩物，并清洁超滤。

清洁和储存方案

根据本报告第 14 页上的图拆卸系统。用 20 升的热的（45-65 摄氏度）软水漂洗 MF，同时截留物阀门半开，将透过物管道通向排水管道。使阀门通向重复循环溶液返回补料罐内，用 2 升热的 0.5M 氢氧化钠 + 400ppm 次氯酸钠重复循环 5 分钟。将溶液从系统中排空，替换为 2 升相同的化学物质。用新鲜的溶液重复循环 30 分钟，然后通过排放阀排空。用 20 升热的软水通过半开的截留物阀门冲洗整个系统。用 4 升水冲洗通过透过物管道，只是将水在膜的截留物一侧重复循环，交叉流速率为 20lpm，TMP 为 6-8psi。剩余的水通过排放阀排空。用 2 升热的 0.5M 柠檬酸溶液在整个系统中重复循环 30 分钟，交叉流速率为 20lpm，TMP 为 6-8psi。然后通过排放阀排空柠檬酸溶液。使用 15 升软水漂洗微滤的截留物一侧，用 4 升漂洗透过物一侧（同腐蚀性氢氧化钠之后的漂洗一样）。2 升热的 0.05M 氢氧化钠 + 400ppm 漂白剂在 MF 中重复循环 15 分钟，然后排空，用 10 升水漂洗截留物一侧，用 4 升水漂洗透过物一侧（同腐蚀性氢氧化钠之后的漂洗一样）。在开始的水冲洗中，通过使截留物阀门排空以及使整个透过物管道排空（不通过阀门），将超滤的截留物和透过物管道直接通向排水管道。泵总是在 11lpm 下运行，即如果截留物压力升高，泵的速度也必须提高以维持 11lpm。用 4 升超纯水漂洗两条管道。用超纯水配置的 2 升 0.5M 氢氧化钠 + 250ppm 次氯酸钠冲洗两条管道。在整个系统中重复循环 2 升新鲜的溶液，使透过物管线与补料罐连接，使截留物阀门向补料罐打开 60 分钟。通过排放阀排空溶液。同初次冲洗一样，将两个管线通向排水管道。用超纯水填满补料罐，通过排放阀排空 1 升水。通过两个管线冲洗 8 升水，再用 4 升水通过透过物管道，截留物的压力为 5psi。然后将 2 升 0.4M 柠檬酸溶液在系统中重复循环 60 分钟。通过排放阀排空酸性溶液，然后用超纯水填满补料罐，通过排放阀排空 1 升水。通过截留物和透过物两条管线冲洗 8 升水，再用 8 升水冲洗透过物管线，跨膜的交叉流速率为 11lpm，截留物压力为 5psi。当两个系统都被

清洁和漂洗后,将它们装配起来用于保存(上面的图)。将2升的0.1M氢氧化钠溶液灌入每一个料液导管,泵到整个系统中,使截留物和透过物阀门打开,进行重复循环,通向废物的阀门关闭,保持两分钟。然后覆盖管道导管并且作出状态标签,表明其是清洁的并且储存于0.1M的氢氧化钠溶液中。

已经显示工艺参数对于生产一致性的物质是重要的。用于澄清的膜是CerCor陶瓷材质的0.2微米孔径大小的膜,1.5平方英寸,30kDa NMWCO Pall Filtron PES 盒式膜,2平方英寸(2个盒子)。对于最佳的IgG1抗体澄清度和通量,微滤的温度应该保持在26-29摄氏度。微滤系统应该在截留物流速为141pm(42cm/s)和跨膜压力为15psig下运行。乳汁应该浓缩至原始混合物体积的40-70%(1.5-2.5倍)。系统的超滤部分应该在截留物流速为1.6-21pm、补料压力为20-30psig下运行。应该通过调整透过物压力使透过物流速与微滤系统的透过物流速相匹配。最终的半成品澄清化浓缩物应该是原始乳汁混合物体积的四分之一(4倍浓缩)。

重组生产

目前正在开发出越来越多的重组蛋白质,用于治疗和诊断的用途。但是,这些蛋白质中有很多难于以功能形式和/或所需量经常规方法生产或者这样的生产方法比较昂贵。通常的方法包括将负责产生某种具体蛋白质的基因插入宿主细胞中,例如细菌、酵母或者哺乳动物细胞如COS或CHO细胞,然后在培养基中培养这些细胞。然后培养的细胞将合成所需的蛋白质。传统的细菌或者酵母系统可能不能以有功能的形式产生许多复杂的蛋白质。尽管哺乳动物细胞可以生产复杂的蛋白质,但是它们的培养一般比较困难和昂贵,而且蛋白质的产量通常只是毫克/升数量级。此外,由于非分泌型蛋白质不被分泌到培养基中,所以从原核或者哺乳动物细胞中纯化它们相对困难。

一般而言，转基因技术的特色是，它是一种制造和分泌一般情况下不被分泌出来的蛋白质（非分泌型蛋白质）的方法。该方法包括用核酸构建体表达蛋白质，该核酸构建体包括：(a) 启动子，例如乳腺上皮细胞特异性启动子，例如乳汁蛋白启动子；(b) 信号序列，它指导蛋白质的分泌，如来自乳汁特异性蛋白质的信号序列；(c) 可选地编码分泌型蛋白质（例如分泌到乳汁中的蛋白质）的氨基末端编码区域足够长的部分的序列，使非分泌型蛋白分泌（例如分泌到转基因哺乳动物的乳汁中）；以及(d) 编码非分泌型蛋白质的序列，其中元件(a)、(b)、(c)（可选性的）和(d) 优选地以上述连接顺序可操作性连接。

在优选的实施方案中：元件 a、b、c（如果有的话）和 d 来自同一基因；元件 a、b、c（如果有的话）和 d 来自两个或者更多基因。

在优选的实施方案中：分泌是分泌到转基因哺乳动物的乳汁中。

在优选的实施方案中：信号序列是 β -酪蛋白的信号序列；启动子是 β -酪蛋白的启动子序列。

在优选的实施方案中，非分泌型蛋白质编码序列：是人源的；编码截短的细胞核或者细胞质多肽；编码人血清白蛋白或者其他所需的目标蛋白。

除非特别指明，本发明在实施中会使用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术，这些技术是在本领域技术范围内的。这些技术在文献中都有描述。参见，例如，Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed.,

1984); Mullis et al. U.S. Patent No : 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); 专题论述集 Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986) ; Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. , 1986)。

乳汁特异性启动子

在实施本发明时有用的转录启动子是那些优先在乳腺上皮细胞中被激活的启动子, 包括控制编码乳汁蛋白〔例如酪蛋白、 β 乳球蛋白 (Clark et al., (1989) Bio/Technology 7: 487-492)、乳清酸蛋白 (Gorton et al. (1987) Bio/Technology 5: 1183-1187)和乳白蛋白 (Soulier et al., (1992) FEBS Letts. 297: 13)〕的基因的启动子。酪蛋白启动子可以来自任何哺乳动物种中的 α , β , γ 或者 κ 酪蛋白基因; 优选的启动子来自山羊 β 酪蛋白基因 (DiTullio, (1992) Bio/Technology 10: 74-77)。乳汁特异性蛋白质启动子或在乳腺组织中被特异激活的启动子可以来自 cDNA 或者基因组序列。优选地, 它们来自基因组序列。

关于所有上面列举的乳腺特异性基因，已经可以获得至少一个、通常是多个生物体的 DNA 序列信息，参见例如 Richards et al., J. Biol. Chem. 256, 526-532 (1981) (大鼠 α 乳白蛋白); Campbell et al., Nucleic Acids Res. 12, 8685-8697 (1984) (大鼠 WAP); Jones et al., J. Biol. Chem. 260, 7042-7050 (1985) (大鼠 β -酪蛋白); Yu-Lee & Rosen, J. Biol. Chem. 258, 10794-10804 (1983) (大鼠 γ -酪蛋白); Hall, Biochem. J. 242, 735-742 (1987) (人 α 乳白蛋白); Stewart, Nucleic Acids Res. 12, 389 (1984) (牛 α s1 和 κ 酪蛋白 cDNAs); Gorodetsky et al., Gene 66, 87-96 (1988) (牛 β -酪蛋白); Alexander et al., Eur. J. Biochem. 178, 395-401 (1988) (牛 κ -酪蛋白); Brignon et al., FEBS Lett. 188, 48-55 (1977) (牛 α s2 酪蛋白); Jamieson et al., Gene 61, 85-90 (1987), Ivanov et al., Biol. Chemet. Hoppe-Seyler 369, 425-429 (1988), Alexander et al., Nucleic Acids Res. 17, 6739 (1989) (牛 β -乳球蛋白); Vilotte et al., Biochimie 69, 609-620 (1987) (牛 α -乳白蛋白)。有关多种不同的乳汁蛋白质基因的结构和功能的综述参见 Mercier & Vilotte, J. Dairy Sci. 76, 3079-3098 (1993) (这里引用其全部内容作为参考，用于所有的目的)。如果还需要额外的序列数据，可以利用已有的序列作为探针，很容易地克隆出已经可以获得的区域的侧翼序列。来自不同生物体中的乳腺特异性调控序列也可以使用已知的同源核苷酸序列或者针对同源蛋白质的抗体作为探针，通过筛选这些生物体的文库而类似地获得。

尽管通过举例说明和实施例对上述的发明进行了描述，以便于理解，显然对于那些本领域的技术人员，可以实施一些改变和调整。因此，上述描述和实施例不应该理解为是对所附权利要求书所确定的本发明范围的限制。

还应当注意到，尽管白蛋白与多种不同的化合物如乙醇和包括磷

酸盐在内的矿物质盐类共同结晶，在文献中没有发现有使用磷酸盐结晶的工业方法。通过本发明的优选实施方案，现在已经发现，通过充分使用本发明的关键工艺参数和/或条件，使用磷酸盐可以便利地结晶人白蛋白。已在上文列出和描述了本发明的参数和一些变动。

因此，应当理解的是，本发明中有关提供改进的切向流过滤方法以便从给定的料液中以高产率生产出目标分子的实施方案只是对本发明原理的应用进行举例说明。从前面的描述中显然可见，在不偏离本发明精神或者所附权利要求的范围的情况下，可以对本发明公开内容的各要件的形式、使用方法和应用进行改变。

* 作为参考文献引用的现有技术文件

1. Andersson, 1966, "The Heterogeneity of Bovine Serum Albumin," BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 117: 115-133.

2. Carter DC, et al., Crystals Of Serum Albumin For Use In Genetic Engineering And Rational Drug Design, US Patent#5,585,466.

3. Alun J, Morgan W, and Pickup RW (1993), Activity Of Microbial Peptidases, Oxidases, And Esterases In Lake Waters Of Varying Trophic Status, CAN J MICROBIOL 39 (8): 795-803.

4. Aranha-Creado H, and Fennington GJ Jr (1997, Cumulative Viral Titer Reduction Demonstrated By Sequential Challenge Of A Tangential Flow Membrane Filtration System And A Direct Flow Pleated Filter Cartridge, PDA J PHARM SCI TECHNOL 51 (5): 208-212.

5. Aravindan GR, et al. , (1997), Identification, Isolation, And Characterization Of A 41-Kilodalton Protein From Rat Germ Cell-Conditioned Medium Exhibiting Concentration-Dependent Dual Biological Activities, ENDOCRINOLOGY 138 (8) : 3259-68.

6. Federspiel G, et al., (1991), Hybridoma Antibody Production In Vitro In Type II Serutiz-Free Medium Using Nutridoma-SP Supplements: Comparisons With In Vivo Methods, J IMMUNOL METHODS 145 (1-2): 213-221.

7. Kahn DW, et al., (2000), Purification Of Plasmid DNA By Tangential Flow Filtration, BIOTECHNOL BIOENG. 69 (1) : 101-106.

8. Kawahara H, et al. , (1994), High-Density Culture Of FM-3A Cells Using A Bioreactor With An External Tangential-Flow Filtration Device, CYTOTECHNOLOGY 14 (1): 61-66.

9. Prado SM, et al., (1999), Development And Validation Study For The Chromatographic Purification Process For Tetanus Anatoxin On Sephacryl S-200 High Resolution, BOLL CHIM FARM. 138 (7): 364-368.

10. Ronco C, et al., (1994), On-Line Filtration Of Dialysate: Structural And Functional Features Of An Asymmetric Polysulfone Hollow Fiber Ultrafilter, INT J ARTIF ORGANS 17 (10): 515-520.

11. Strauss PR (1995), Use Of Filtron Mini-Ultrasettetm Tangential Flow Device And Filtron Microseptm Centrifugal

Concentrators In The Early Stages Of Purification Of DNA Polymerases, BIOTECHNIQUES 18 (1) : 158-160.

12. Porter, ed. , HANDBOOK OF INDUSTRIAL MEMBRANE TECHNOLOGY, (Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey, 1998) pp. 160-176.

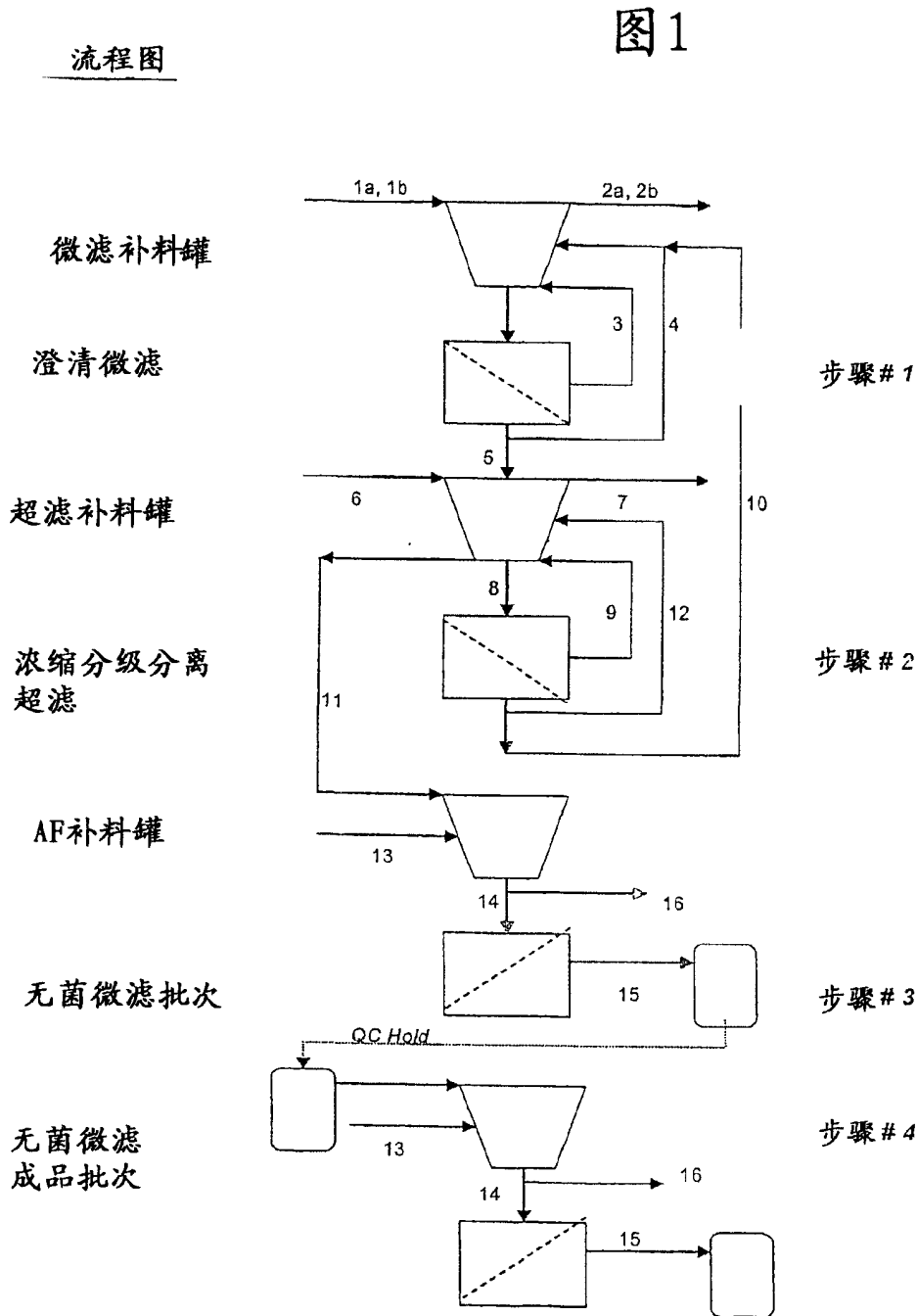
13. Gabler et al. , (1987), Principles of Tangential Flow Filtration : Applications to Biological Processing, in FILTRATION IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY, pp. 453-490.

14. van Reis et al., United States Patent No# 5,256,294; Tangential Flow Filtration Process And Apparatus.

15. Lenk, et al., United States Patent No# 5,948,441; Method For Size Separation Of Particles.

16. van Reis et al., United States Patent No# 5,490,937; Tangential Flow Filtration Process And Apparatus.

17. Marinaccio, et al. , United States Patent No# 4,888,115; Cross-Flow Filtration



经料液通过TFF最终到灌装并结束的物质流动工艺流程图

图 2A

设备如下组装:

(微滤装置):

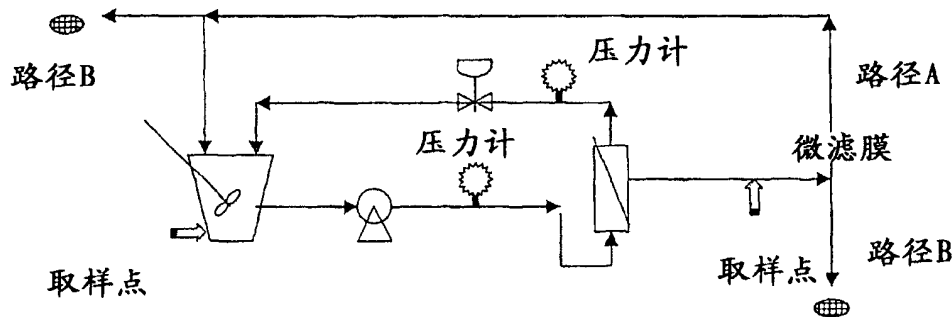
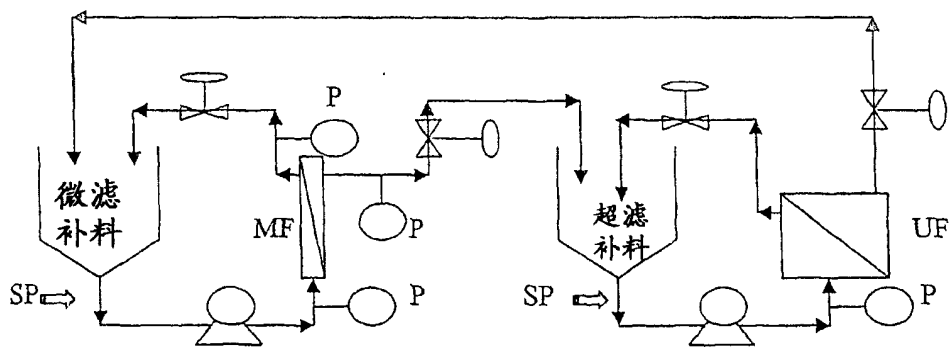


图 2B

(双TFF系统)



阴影箭头表示取样点

图3

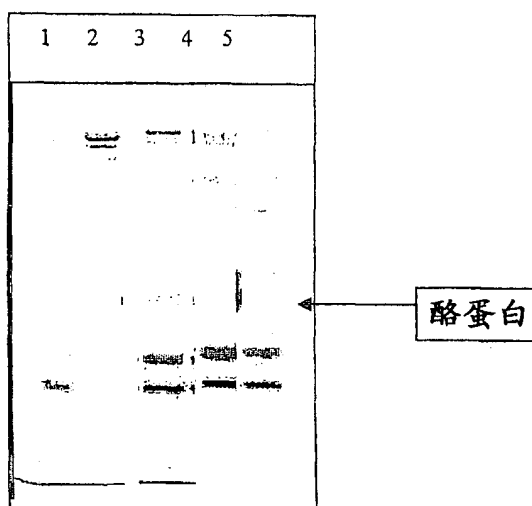


图4

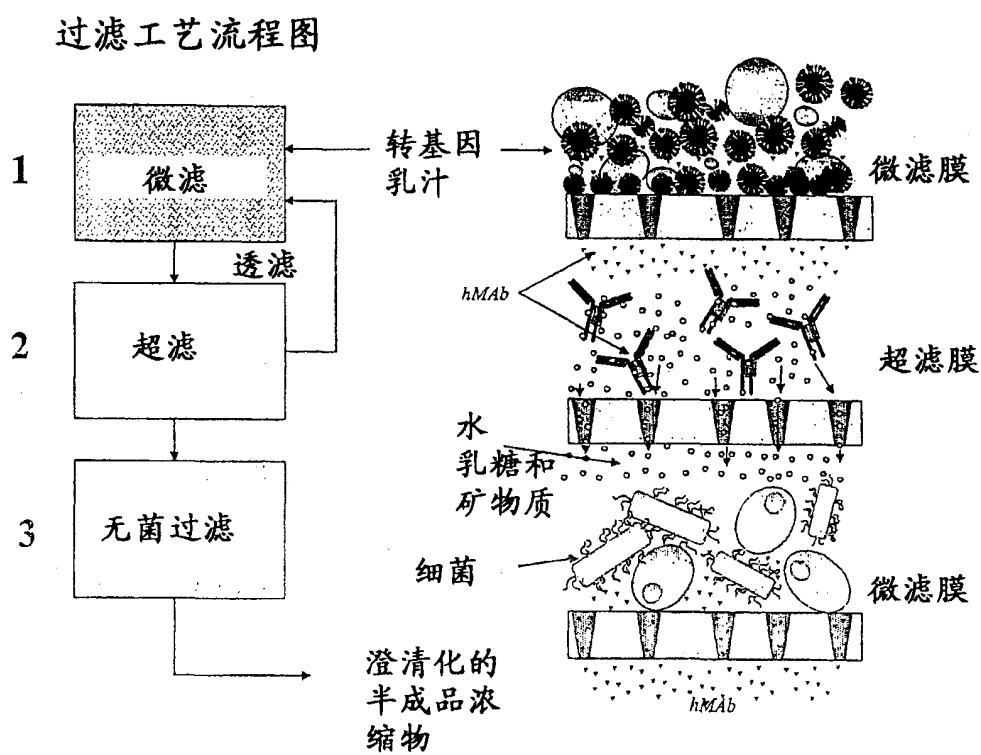


图5

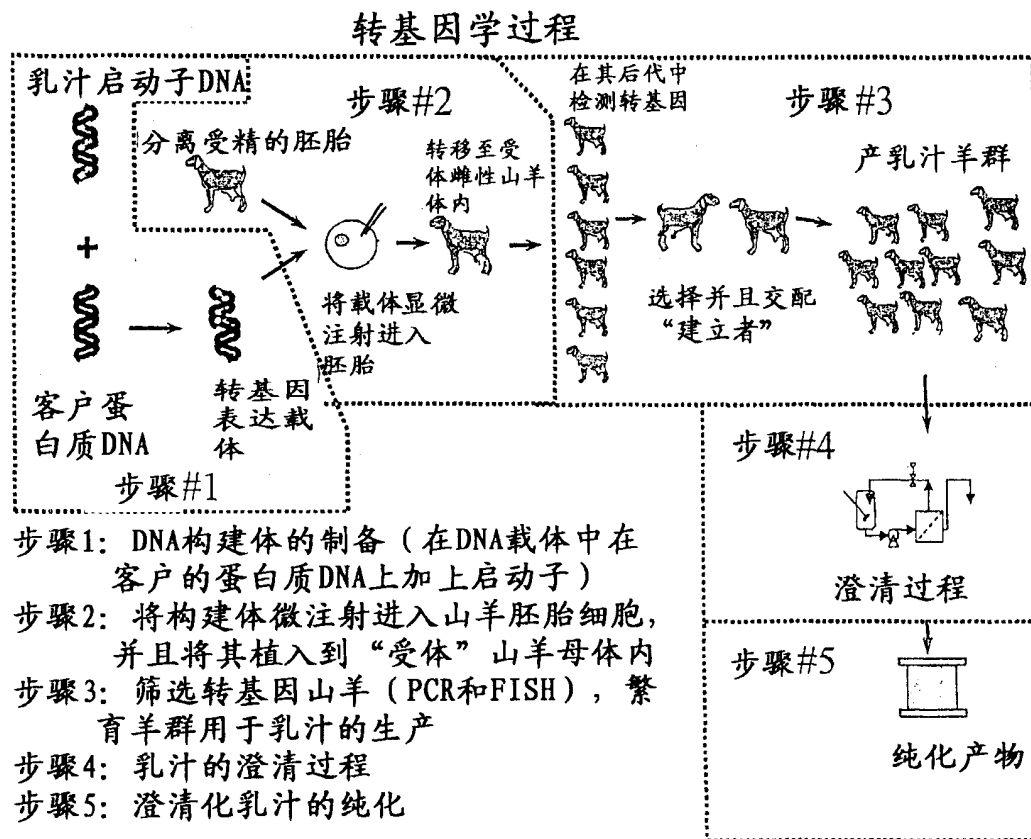


图6

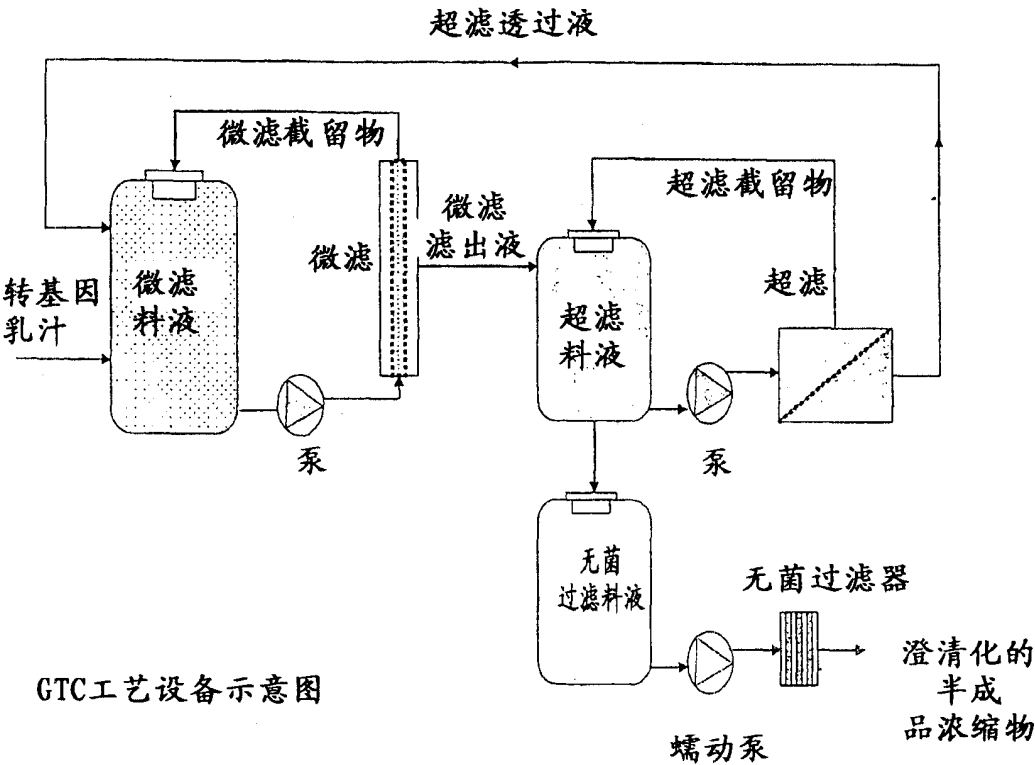


图7

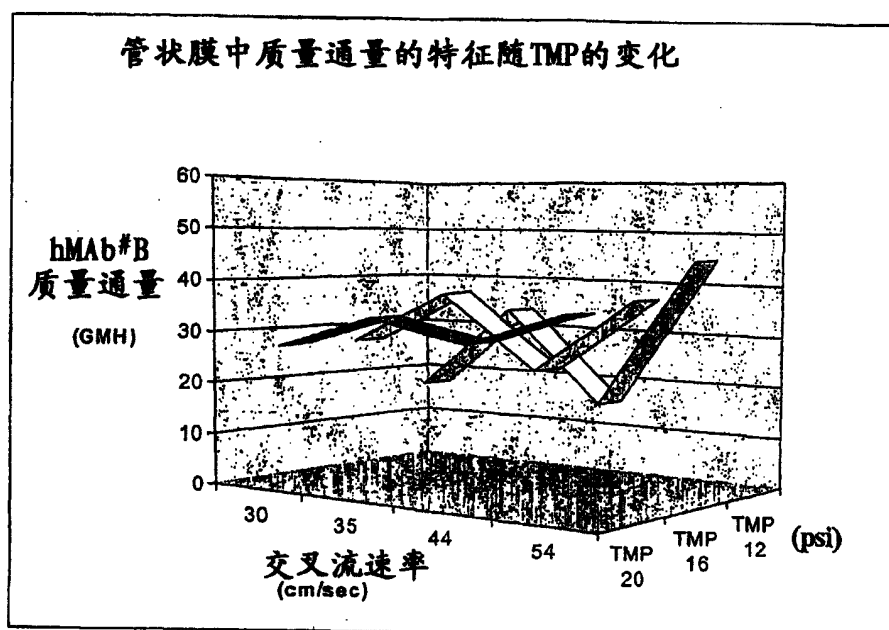


图8

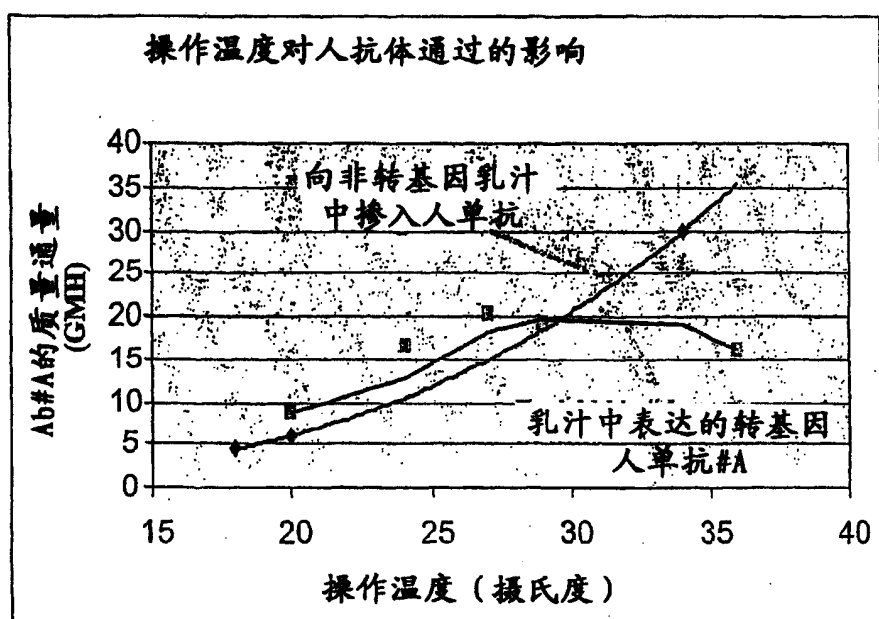


图9

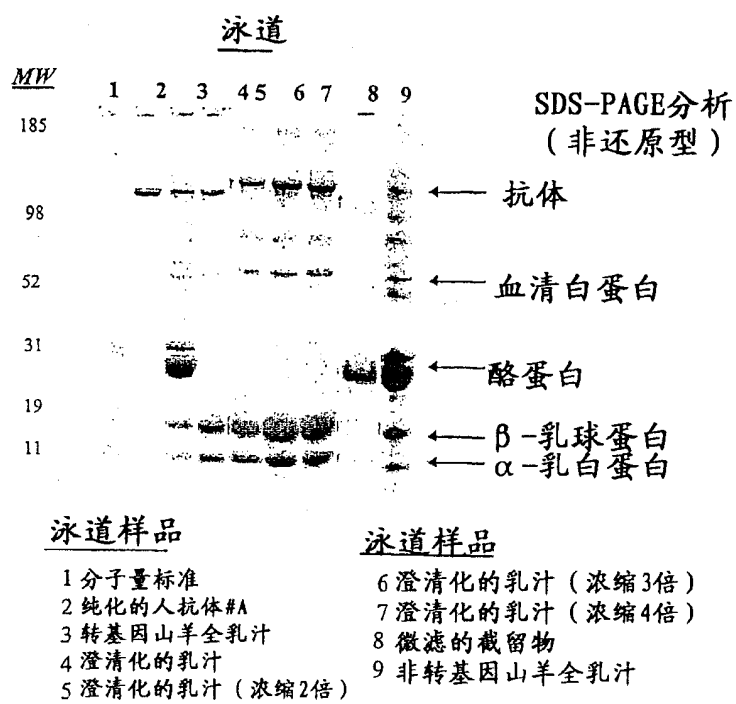


图10

